

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 955 496**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
(21) N° d'enregistrement national : **10 50430**

(51) Int Cl⁸ : **A 61 K 38/57** (2006.01), A 61 P 33/02

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(54) L'APROTININE POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES PARASITAIRES ET LE PRONOSTIC DE LA TRYPANOTOLERANCE BOVINE.

(22) Date de dépôt : 22.01.10.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD) Etablissement public et CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablissement public — FR.

(72) Inventeur(s) : BERTHIER DAVID, CUNY GERARD, THEVENON SOPHIE, CHANTAL ISABELLE et BOISSIERE ANNE.

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 29.07.11 Bulletin 11/30.

(45) Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 02.03.12 Bulletin 12/09.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

(73) Titulaire(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD) Etablissement public, CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablissement public.

(74) Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

FR 2 955 496 - B1



L'Aprotinine pour le Traitement des Maladies Parasitaires et le Pronostic de la Trypanotolérance Bovine

Domaine de l'Invention

La présente invention concerne l'utilisation de l'aprotinine dans le traitement des
5 infections parasitaires, en particulier pour lutter contre les effets pathogènes induits par les
parasites de la famille des *Trypanosomatidae*. L'invention concerne également l'utilisation
de l'aprotinine pour le pronostic de la tolérance animale à ces infections parasitaires.

Contexte de l'Invention

Les maladies parasitaires sont préoccupantes tant du point de vue de leur impact sur la
10 santé publique que du point de vue de leurs conséquences sur l'économie des pays en voie de
développement. Elles sont d'autant plus préoccupantes qu'on observe, depuis une vingtaine
d'années, des phénomènes de réémergence. Ainsi, en Afrique, les trypanosomoses humaines
(THA) qui, pendant un temps, étaient pratiquement éradiquées, et les trypanosomoses
15 animales (TAA) posent aujourd'hui de sérieux problèmes dans les secteurs de santé publique
et animale et de l'économie agricole.

Les trypanosomoses africaines sont provoquées par des hémoprotozoaires flagellés (les
trypanosomes) et sont principalement transmises par un insecte hématophage, la glossine ou
mouche sté-sté, chez lequel le parasite accomplit une évolution cyclique plus ou moins
complexe avant d'être à nouveau transmis. Chez l'homme, ces parasites sont responsables de
20 la « maladie du sommeil » (ou THA). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime
qu'en Afrique il existe plus de 250 foyers dans lesquels environ 60 millions de personnes sont
exposées et 300 000 individus sont infectés annuellement. Dans de nombreux pays africains,
la prévalence de la maladie est aujourd'hui équivalente à ce qu'elle était dans les années 1930
avant la mise en place des mesures de contrôle et de dépistage de la maladie.

25 La trypanosomose animale, également appelée Nagana, sévit dans toutes les régions
d'Afrique infestées par les glossines, soit un tiers du continent africain. La maladie affecte
une quarantaine de pays, et on estime que 50 millions de bovins et 100 millions de petits
ruminants y sont exposés. Aujourd'hui, la trypanosomose animale demeure un obstacle
majeur au développement de l'élevage et de l'agriculture dans les régions d'Afrique sub-
30 saharienne qui offrent pourtant de fortes potentialités fourragères et agricoles. En effet, chez
les animaux infectés, la maladie peut entraîner un retard de croissance, un fort
amaigrissement, une baisse de fécondité, un taux d'avortements accru, une chute de la

production laitière et/ou une capacité de traction amoindrie, et dans les cas les plus graves, une mort rapide. La morbidité et la mortalité du bétail dans les économies rurales fragiles ont des conséquences désastreuses sur l'alimentation humaine et causent des pertes économiques considérables dans de nombreux pays d'Afrique.

5 Les trypanosomoses évoluent le plus souvent sous une forme chronique – c'est le cas des trypanosomoses humaines provoquées par le *Trypanosoma brucei gambiense* (90% des cas répertoriés) que l'on retrouve en Afrique centrale et de l'ouest, et de la majorité des trypanosomoses animales (provoquées par le *T. brucei brucei*, *T. congolense* ou *T. vivax*). La forme aigüe chez l'homme est due au *T. brucei rhodesiense* en Afrique orientale et australe, et
 10 constitue en moyenne 10% des cas répertoriés. Chez les animaux, certaines souches de *T. congolense* et *T. vivax* peuvent provoquer des atteintes sévères à évolution rapide. La symptomatologie est variable et souvent liée à l'espèce de trypanosomes mais également à la sensibilité de l'hôte. Certaines races bovines (*Bos taurus* : N'Dama) sont, par exemple, beaucoup plus tolérantes aux infections que les races exotiques (*Bos indicus* : zébu, et *Bos*
 15 *taurus* européens). Cette trypanotolérance est multifactorielle et sous dépendance génétique.

Actuellement, des moyens de lutte existent, mais ils se révèlent insuffisants pour endiguer la maladie. Ces méthodes visent le parasite ou le vecteur. La lutte anti-vectorielle se fait à plusieurs niveaux : à l'échelle individuelle par l'application épicutanée de formulations insecticides sur le bétail ou la pose de leurres attractifs et à l'échelle régionale
 20 par des épandages aériens. La lutte biologique, notamment l'introduction de mâles stériles, est également utilisée. Bien qu'efficaces sur des zones restreintes, ces méthodes s'avèrent insuffisantes pour éradiquer les glossines sur des territoires plus vastes. La lutte contre le parasite consiste en l'administration de traitements trypanocides curatifs ou préventifs. Pour les trypanosomoses animales africaines, les traitements diffèrent en fonction de l'espèce
 25 parasitaire. Chez les ruminants, l'acétate de diminazène (BERENIL[®] et VERIBEN[®]) et le chlorure d'isométhamidium (SAMORIN[®] et TRYPANIDIUM[®]) sont les composés les plus utilisés notamment contre *T. vivax*, *T. congolense* et *T. brucei*. Comme aucun autre agent trypanocide n'a été introduit sur le marché depuis plus de trente ans, ces médicaments ont été utilisés de façon intensive, mais un usage inadéquat a largement contribué à l'apparition de
 30 souches résistantes de trypanosomes.

Il est donc crucial de développer de nouvelles stratégies de lutte et de nouveaux traitements contre les trypanosomoses animales qui affectent non seulement de nombreux

pays d'Afrique mais également d'autres parties du globe comme l'Amérique latine et l'Asie du Sud-Est.

Résumé de l'Invention

Dans le cadre de l'étude de la trypanotolérance chez les bovins, les inventeurs se sont
 5 intéressés aux gènes impliqués dans ce phénomène. Ils ont ainsi identifié un inhibiteur de
 sérines protéases, l'aprotinine, qui, chez les animaux tolérants, est surexprimée au moment où
 la parasitémie est maximale mais dont l'expression chez les animaux sensibles est
 relativement basse et stable. L'aprotinine ou BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) est
 10 une molécule relativement bien connue qui a été largement utilisée en chirurgie cardiaque
 pour ses propriétés anti-inflammatoires et ses actions anti-thrombotique et anti-fibrinolytique.
 Cependant, cette molécule d'origine bovine a provoqué des réactions allergiques parfois
 violentes chez certains patients, ce qui a conduit les Etats-Unis et l'Europe à interdire son
 utilisation chez l'homme.

Les inventeurs ont mis en évidence, pour la première fois, que l'aprotinine a également
 15 des effets anti-parasitaires importants non seulement sur les trypanosomes mais aussi sur les
 leishmanies. En effet, les résultats qu'ils ont obtenus montrent non seulement que la mortalité
 parasitaire *in vitro* est augmentée de 50% en présence d'aprotinine (voir Exemple 2) mais
 également que l'aprotinine cause une inhibition de plus de 50% de l'activité enzymatique de
 lysats parasitaires *in vitro* (voir Exemple 3). De plus, l'aprotinine présente une activité
 20 inhibitrice importante sur la production d'oxide nitrique (NO) chez les macrophages, qui
 jouent un rôle déterminant dans la réponse de l'hôte aux infections par les protozoaires (voir
 Exemple 1).

En conséquence, un premier aspect de la présente invention est basé sur l'action anti-
 parasitaire de l'aprotinine, et un deuxième aspect de l'invention est basé sur l'implication de
 25 l'aprotinine dans les phénomènes de tolérance aux trypanosomoses animales.

Plus spécifiquement, dans un premier aspect, l'invention se rapporte à l'utilisation de
 l'aprotinine dans le traitement de maladies ou infections parasitaires animales provoquées par
 des protozoaires, en particulier les maladies ou infections parasitaires qui affectent les
 mammifères domestiqués, notamment le bétail, préférablement les ruminants (bovidés,
 30 caprins et ovins) et les suidés, et plus préférablement encore les bovins et les suidés.

Dans certains modes de réalisation préférés, l'aprotinine est utilisée dans le traitement
 de maladies ou infections parasitaires animales provoquées par des protozoaires flagellés.

Les maladies ou infections parasitaires provoquées par des protozoaires flagellés et affectant les mammifères domestiqués incluent, sans limitation, les lambliaoses, trypanosomiases, leishmanioses et trichomonoses. Préférentiellement, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires animales provoquées par les parasites de la famille des
 5 *Trypanosomatidae*, en particulier les parasites appartenant au genre *Trypanosoma* ou au genre *Leishmania*.

Les parasites du genre *Trypanosoma* incluent, sans limitation, *T. ambystomae*, *T. avium*, *T. boissoni*, *T. brucei* (*T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiensi*, *T. gambiensi*), *T. cruzi*, *T. congolense* (*T. congolense savannah*, *T. congolense forest*, *T. congolense tsavo*, *T. congolense kilifi*), *T. equinum*, *T. equiperdum*, *T. megatrypanum*, *T. uniforme*, *T. musculi*, *T. evansi*, *T. everetti*, *T. hosei*, *T. lewisi*, *T. godfreyi*, *T. malophagium*, *T. paddae*, *T. parroti*, *T. percae*, *T. rangeli*, *T. rotatorium*, *T. rugosae*, *T. sergenti*, *T. simiae*, *T. sinipercae*, *T. suis*, *T. triglæ* et *T. vivax*. Les parasites du genre *Trypanosoma* qui peuvent être pathogènes pour le bétail incluent *T. congolense*, *T. brucei*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. theileri* et *T. simiae*.

15 Dans certains modes de réalisation préférés, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires affectant le bétail, en particulier les bovins, et provoquées par *T. congolense*, *T. brucei* ou *T. vivax*, et préférentiellement provoquées par *T. congolense*.

Les parasites du genre *Leishmania* incluent, sans limitation, *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. aristidesi*, *L. deanei*, *L. donovani*, *L. enrietti*, *L. forattinii*, *L. gorhami*, *L. herreri*, *L. hertigi*, *L. infantum*, *L. killicki*, *L. major*, *L. enriettii*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. tropica*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) colombiensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) lainsoni*, *L. (Viannia) naiffi*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) pifanoi*, *L. (Viannia) shawi*, *L. tarentolae*, *L. tropica*, *L. turanica*, and *L. venezuelensis*. Notamment, *L. infantum*, présent dans le sud de la France, est responsable
 25 de la leishmaniose chez le chien et est également une zoonose, pour laquelle le chien constitue le réservoir de la maladie humaine. Dans certains modes de réalisation préférés, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires affectant le chien et l'homme et provoquées par *L. infantum* and *L. donovani*.

30 Dans certains modes de réalisation préférés, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires animales provoquées par des protozoaires et affectant les bovins. Des exemples de telles maladies ou infections parasitaires incluent, sans limitation, la trypanosomiase bovine, la lambliaose bovine, la trichomonose bovine, la babésiose bovine, la besnoitiose bovine, la néosporose bovine, la thélériose bovine, la

toxoplasmose bovine, la cryptosporidiose bovine, la sarcocysse bovine et la coccidiose bovine.

Dans une variante du premier aspect, l'invention se rapporte à des préparations pharmaceutiques comprenant de l'aprotinine et au moins un véhicule ou excipient acceptable sur le plan vétérinaire. Les préparations pharmaceutiques selon l'invention sont destinées à être utilisées dans le traitement d'une maladie ou infection parasitaire animale, comme décrit ci-dessus. Dans certains modes de réalisation, les préparations pharmaceutiques de l'invention comprennent en outre un autre principe actif pharmaceutique.

Dans une autre variante du premier aspect, l'invention se rapporte à l'utilisation de l'aprotinine pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des maladies ou infections parasitaires animales comme décrit ci-dessus.

Dans encore une autre variante du premier aspect, l'invention se rapporte à une méthode de traitement d'une maladie ou infection parasitaire animale comme décrit ci-dessus comprenant une étape d'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'aprotinine à un animal infecté.

Dans un deuxième aspect, l'invention concerne l'aprotinine pour son utilisation comme biomarqueur de la trypanotolérance bovine.

Dans une variante de ce deuxième aspect, l'invention se rapporte à une méthode *in vitro* pour le pronostic de la tolérance aux infections trypanosomiennes chez les bovins. D'une manière générale, la méthode comprend une étape de détermination de la quantité d'aprotinine dans un échantillon biologique obtenu d'un bovin. L'échantillon biologique peut être tout fluide ou tissu biologique bovin connu pour contenir de l'aprotinine. Préférentiellement, l'échantillon biologique est du sang ou du sérum prélevé chez le bovin testé. La détermination de la quantité d'aprotinine dans l'échantillon biologique peut être effectuée par n'importe quelle méthode appropriée pour la quantification des protéines, par exemple un immunoessai, tel qu'un test de type ELISA.

Dans certains modes de réalisation préférés, la quantité d'aprotinine déterminée par la méthode de l'invention est comparée à la quantité d'aprotinine moyenne chez un bovin trypanotolérant et/ou à la quantité d'aprotinine moyenne chez un bovin sensible. Préférentiellement, le bovin testé et le bovin de contrôle (trypanotolérant ou sensible) sont de la même race, et éventuellement du même âge et du même sexe. La comparaison des quantités d'aprotinine permet de déterminer si le bovin testé est tolérant ou sensible aux infections

trypanosomiennes. Cette méthode peut être utilisée, par exemple, pour sélectionner les animaux les plus tolérants dans le but de diffuser le caractère tolérant au sein d'un troupeau.

Dans une autre variante de ce deuxième aspect, l'invention se rapporte à un kit pour le pronostic de la trypanotolérance chez les bovins. Le kit comprend un anticorps spécifique de l'aprotinine, un réactif permettant de détecter un complexe anticorps-aprotinine formé entre l'anticorps et l'aprotinine présente dans un échantillon biologique, et des instructions pour effectuer une méthode de pronostic selon l'invention.

Une description plus détaillée de certains modes de réalisation préférés de l'invention est donnée ci-dessous.

10 Description Détaillée de l'Invention

D'une manière générale, la présente invention se rapporte à de nouvelles utilisations de l'aprotinine liées d'une part à son action anti-parasitaire et d'autre part à son implication dans le phénomène de trypanotolérance des bovins.

I - L'Aprotinine comme Agent Anti-parasitaire

Comme mentionné plus haut, l'invention concerne l'aprotinine pour son utilisation dans le traitement de maladies ou infections parasitaires animales provoquées par des protozoaires et affectant des mammifères, en particulier des mammifères domestiqués. Dans le contexte de la présente invention, les termes "aprotinine", "Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor/IV" et "BPTI" sont utilisés de façon interchangeable.

L'aprotinine est un inhibiteur de sérines protéases de type Kunitz, qui est présente dans une large variété de tissus et d'organes chez les bovins (pancréas, foie, poumons, glande parotide, rate, ganglions lymphatiques). Les enzymes protéolytiques connues pour être inhibées par cette molécule incluent la trypsine, la kallicréine, la chymotrypsine et la plasmine. L'aprotinine est un polypeptide globulaire monomérique de poids moléculaire d'environ 6512 daltons, contenant 58 acides aminés et trois ponts disulfides liant des résidus cystéines situés aux positions 5 et 55, 14 et 38, et 30 et 51 (Kassel *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 18: 255-258 ; Kassel *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 20: 463-468). Le gène codant pour le BPTI a été identifié et séquencé (NCBI Reference Sequence: NM_001001554.2).

L'aprotinine est connue pour avoir certaines propriétés intéressantes du point de vue thérapeutique. En particulier, elle a une action efficace dans les dysfonctionnements des

systèmes hémostatique et fibrinolytique. Avant d'être retiré du marché, TRASYLOL[®], dont le principe actif est l'aprotinine isolée d'organes bovins, a longtemps été utilisé pour réduire les saignements pendant les procédures chirurgicales complexes, comme les chirurgies cardiaques et les transplantations hépatiques (van Oeveren *et al.*, Ann. Thorac. Surg., 1987, 44: 640-645; Bistrup *et al.*, Lancet I, 1988, 366-367; Royston, J. Cardiothorac. Vasc. Anesth., 1992, 6: 76-100; Porte *et al.*, J. Cardiothorac. Vasc. Anesth., 2004, 18(4 Suppl): 31S-37S). L'aprotinine possède également des propriétés anti-inflammatoires (Asimakopoulos *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 2000, 120(2): 361-369; Mojcik *et al.*, Ann. Thorac. Surg., 2001, 71(2) : 745-754 ; Ascenzi *et al.*, Curr. Protein Pept. Sci., 2003, 4(3): 231-251) ainsi que des propriétés anti-oxydantes qui résultent du fait qu'elle réduit la production d'oxyde nitrique par inhibition de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (Bruda *et al.*, Clin. Sci. (London), 1998, 94: 505-509; Venturi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 249: 263-265).

Les inventeurs ont, pour la première fois, mis en évidence l'activité anti-parasitaire de l'aprotinine. Dans le contexte de la présente invention, les termes "aprotinine", "Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor/IV" et "BPTI" sont entendus comme incluant le polypeptide de 58 acides aminés dont la formule et la structure sont connues depuis longtemps (numéro CAS: 9087-70-1), mais également toute molécule d'aprotinine native d'origine bovine (c'est-à-dire isolée d'un bovin) ainsi que tout homologue et tout variant d'aprotinine qui possède des propriétés anti-parasitaires similaires à celles du polypeptide de 58 acides aminés connu.

L'homme du métier reconnaîtra que, dans la mise en œuvre de la présente invention, l'aprotinine peut avoir été préparée par n'importe quelle méthode appropriée, la méthode d'obtention de l'aprotinine n'étant pas un élément critique ou limitant de l'invention. Ainsi, par exemple, l'aprotinine peut être extraite de sources naturelles (tissus ou organes bovins tels que les poumons, le pancréas ou les glandes parotides) ou préparée par des méthodes recombinantes, et son obtention peut inclure des étapes de modifications chimiques et/ou de purification.

L'aprotinine selon l'invention peut être administrée comme telle ou sous la forme d'une préparation ou composition pharmaceutique. En conséquence, la présente invention fournit des compositions pharmaceutiques comprenant de l'aprotinine et au moins un véhicule ou excipient acceptable du point de vue vétérinaire. Dans le contexte de la présente invention, on entend par "véhicule ou excipient acceptable sur le plan vétérinaire" tout milieu ou additif qui

n'interfère pas avec l'efficacité de l'activité biologique du principe actif (ici l'aprotinine), et qui n'est pas excessivement toxique pour le mammifère traité, aux concentrations auxquelles il est administré.

Les compositions pharmaceutiques de la présente invention peuvent être administrées en utilisant toute combinaison de dosage et voie d'administration qui est efficace pour obtenir l'effet thérapeutique désiré. La quantité exacte à administrer peut varier d'une espèce animale à une autre, d'une race animale à une autre, et même d'un animal à un autre animal (de la même espèce et de la même race) par exemple en fonction du poids et/ou de l'âge. La quantité à administrer peut également varier en fonction de la nature de l'espèce parasitaire. La voie d'administration (orale, parentérale, cutanée, transdermique, etc.) peut être choisie en fonction de la nature de la maladie ou infection parasitaire, du nombre d'animaux à traiter, etc.

La formulation d'une composition pharmaceutique de la présente invention peut varier en fonction de la voie d'administration et du dosage. Après formulation avec au moins un véhicule ou excipient acceptable sur le plan vétérinaire, une composition pharmaceutique de l'invention peut être sous toute forme appropriée pour l'administration à un mammifère, par exemple sous la forme de tablettes, comprimés, dragées, capsules, poudres, sirops, solutions injectables, etc. L'homme de l'art sait sélectionner les véhicules et excipients les plus appropriés à la préparation d'un certain type de formulation. Ainsi, par exemple, les excipients tels que l'eau, 2-3-butanediol, solution isotonique de chlorure de sodium, mono ou diglycérides synthétiques, et acide oléique sont souvent utilisés pour la formulation de préparations injectables. Les compositions liquides, y compris les émulsions, microémulsions, solutions, suspensions, sirops, etc., peuvent être formulées en présence de solvants, d'agents solubilisants, d'émulsifiants, d'huiles, d'acides gras et d'autres additifs comme des agents de suspension, des conservateurs, des agents viscosants, etc. Les compositions solides pour administration par voie orale peuvent être formulées en présence d'un excipient inerte comme le citrate de sodium, et éventuellement d'additifs tels que des agents liants, des agents humectants, des agents de désintégration, des accélérateurs d'absorption, des agents lubrifiants, etc.

Dans certains modes de réalisation, une composition pharmaceutique selon la présente invention est formulée pour une libération immédiate du principe actif (ici l'aprotinine). Alternativement, une composition pharmaceutique peut être formulée pour une libération prolongée du principe actif. De nombreuses stratégies sont connues dans l'art pour provoquer

une libération prolongée d'un principe actif, comme par exemple une augmentation du temps de séjour dans l'estomac, en utilisant des enrobages sensibles au pH et/ou à des actions enzymatiques, ou des enrobages bioadhésifs qui s'accrochent aux parois de l'estomac ou de l'intestin, ou encore en utilisant des systèmes d'encapsulation.

5 Les compositions pharmaceutiques de la présente invention peuvent, en outre, contenir au moins un principe actif pharmaceutique supplémentaire (c'est-à-dire, en plus de l'aprotinine). On entend par "principe actif pharmaceutique" tout composé ou substance dont l'administration a un effet thérapeutique ou un effet bénéfique à la santé ou condition générale d'un mammifère à qui il est administré. Ainsi, un principe actif pharmaceutique peut être
10 actif contre la maladie que l'on veut soigner par administration de la composition pharmaceutique (c'est-à-dire une maladie ou infection parasitaire provoquée par un protozoaire) ; peut être actif contre une condition associée à la maladie que l'on veut soigner par administration de la composition pharmaceutique ; ou peut accroître la disponibilité et/ou l'activité de l'aprotinine comprise dans la composition pharmaceutique.

15 Des exemples de principes actifs pharmaceutiques qui peuvent être présents dans une composition de la présente invention incluent, sans limitation, des antibiotiques, des anti-inflammatoires, des stimulants de croissance, des vitamines, et d'autres agents anti-parasitaires. En règle générale, le ou les principes actifs pharmaceutiques présents dans la composition pharmaceutique sont appropriés aux mammifères auxquels la composition
20 pharmaceutique est destinée.

La présente invention concerne également une méthode de traitement de maladies ou infections parasitaires animales comprenant une étape dans laquelle une quantité thérapeutiquement efficace d'aprotinine ou d'une composition pharmaceutique décrite ici est administrée à un mammifère infecté par un protozoaire pathogène. Dans le contexte de la
25 présente invention, on entend par "traitement" une méthode qui a pour but (1) de retarder ou prévenir le début d'une maladie ou infection parasitaire animale provoquée par un protozoaire, (2) de ralentir ou d'arrêter la progression, l'aggravation ou la détérioration des symptômes de la maladie, (3) d'apporter des améliorations des symptômes de la maladie, et/ou (4) de guérir la maladie. Un traitement peut être administré avant le début de la maladie
30 pour une action préventive, ou il peut être administré après initiation de la maladie pour une action curative.

L'aprotinine (ou une composition pharmaceutique selon l'invention) peut être utilisée pour le traitement de toute maladie ou infection parasitaire animale provoquée par un protozoaire, pour laquelle l'administration d'aprotinine résulte en une amélioration des symptômes de la maladie ou infection parasitaire.

5 Dans certains modes de réalisation préférés, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires affectant les mammifères domestiqués et causées par des protozoaires flagellés, c'est-à-dire des eucaryotes unicellulaires pourvus de flagelles, qui sont des organes filiformes et contractiles qui assurent la locomotion. Des exemples de telles maladies incluent, sans limitation, les trypanosomiasés (causées par des parasites du genre
10 *Trypanosoma*), les leishmaniosés (causées par des parasites du genre *Leishmania*), les lambliaes (causées par des parasites du genre *Giardia*), et les trichomonosés (causées par des parasites du genre *Trichomonas*).

Préférentiellement, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires animales provoquées par les parasites de la famille des *Trypanosomatidae*, en
15 particulier les parasites appartenant au genre *Trypanosoma* ou au genre *Leishmania*.

Dans certains modes de réalisation préférés, la maladie ou infection parasitaire affecte les mammifères domestiqués, en particulier le bétail, c'est-à-dire les bovins, les ovins, les caprins et les buffles. Préférentiellement, l'aprotinine est utilisée dans le traitement de maladies ou infections parasitaires causées par des protozoaires et affectant les bovins. En effet,
20 l'aprotinine selon l'invention étant une molécule endogène, elle est extrêmement bien tolérée par les bovins. Les maladies ou infections parasitaires dues à des protozoaires et affectant les bovins incluent, sans limitation, la trypanosomiase bovine, la lambliaie bovine (une maladie provoquée par le *Giardia lamblia* et qui affecte le tractus gastro-intestinal), la trichomonose bovine (une maladie vénérienne provoquée par le *Tritrichomonas foetus* qui cause une
25 inflammation de l'appareil reproducteur à l'origine d'avortements précoces), la babésiose bovine (une maladie due à un babesia (*B. divergens*, *B. microti*) qui cause généralement une anémie hémolytique par destruction des globules rouges), la besnoitiose (une maladie due à *Besnoitia besnoiti*, parasite du système des phagocytes mononucléés), la néosporose (une maladie due à *Néospora caninum*, responsable d'avortements chez la vache), la théilériose
30 bovine (provoquée par des parasites du genre *Theileria* qui causent en Afrique subsaharienne, l'East Coast Fever, la maladie de Corridor et la Maladie de Janvier chez les bovins), la toxoplasmose bovine (une maladie due au *Toxoplasma gondii*), la cryptosporidiose bovine (une maladie intestinale grave chez les veaux qui est causée par un parasite du genre

Cryptosporidium), sarcocystose bovine (une infection du muscle strié causée par des parasites du genre *Sarcosystis*), et la coccidiose (une maladie de l'appareil digestif, due au genre *Eimeria*).

La présente invention comprend également toute molécule homologue à l'aprotinine et d'origine mammifère autre que bovine, par exemple d'origine ovine, caprine, canine, etc, et même humaine, pour son utilisation dans le traitement de maladies ou infections parasitaires provoquées par des protozoaires et affectant les mammifères correspondants, par exemple respectivement les ovins, les caprins, les chiens, etc. et même les humains.

II - L'Aprotinine comme Marqueur de la Trypanotolérance Bovine

Dans un autre aspect, l'invention concerne l'aprotinine pour son utilisation comme biomarqueur de la trypanotolérance bovine. Le terme "biomarqueur", tel qu'utilisé ici, fait référence à une substance qui est un indicateur distinctif d'un processus biologique, d'un événement biologique et/ou d'une condition biologique. Les inventeurs ont mis en évidence que, chez les bovins sensibles aux infections trypanosomiennes, l'expression du gène codant pour l'aprotinine est relativement basse et stable tandis que chez les animaux trypanotolérants, l'expression de ce gène est généralement plus élevée et le gène est surexprimé au moment où la parasitémie est maximale.

L'invention fournit donc une méthode *in vitro* pour le pronostic de la tolérance aux infections trypanosomiennes chez les bovins, c'est-à-dire pour déterminer si un bovin est tolérant ou sensible aux trypanosomoses. Cette méthode comprend une étape de détermination de la quantité d'aprotinine dans un échantillon biologique obtenu d'un bovin. Par "échantillon biologique", on entend ici tout échantillon de fluide ou tissu isolé d'un bovin dans lesquels la présence d'aprotinine peut être détectée (sang, sérum, pancréas, foie, poumons, glande parotide, rate, ganglions lymphatiques). L'échantillon biologique peut être prélevé d'un bovin vivant (auquel cas l'échantillon biologique sera choisi parmi ceux qui ne nécessitent pas une procédure d'obtention invasive, par exemple par prélèvement sanguin) ou d'un bovin mort (par exemple par biopsie). L'échantillon peut également être un échantillon tissulaire cryopréservé et archivé. Le terme "échantillon biologique" sous-entend également tout matériel dérivé par traitement ou manipulation d'un échantillon biologique. Le traitement ou la manipulation d'un échantillon biologique peut inclure des étapes de filtration, centrifugation, distillation, extraction, concentration, inactivation de composés interférents, addition de réactifs, etc. Dans les cas où la méthode est utilisée pour tester la

trypanotolérance d'un bovin vivant, l'échantillon biologique est préférablement du sang ou du sérum.

Dans certains modes de réalisation, la méthode comprend en outre une étape dans laquelle la quantité d'aprotinine mesurée dans l'échantillon biologique du bovin à tester est comparée à la quantité moyenne d'aprotinine mesurée dans un échantillon biologique de même nature chez un bovin trypanotolérant et/ou chez un bovin sensible aux infections trypanosomiennes. Préférentiellement, le bovin testé et le bovin de contrôle (ou groupe de bovins de contrôle) sont de la même race, et éventuellement du même âge et du même sexe. La comparaison des quantités d'aprotinine permet de déterminer si le bovin testé est tolérant ou sensible aux infections trypanosomiennes.

Dans le contexte de la présente invention, la détermination de la quantité d'aprotinine dans un échantillon biologique peut être effectuée par n'importe quelle méthode connue dans l'art et appropriée pour la quantification des protéines. En particulier, l'aprotinine peut être détectée et quantifiée par un immunoessai ou dosage immunologique. Il existe une large variété de techniques d'immunoessais, tels que les dosages radioimmunologiques, les dosages immunoenzymatiques, les ELISA ou dosages immunoenzymatiques sur support solide, et les dosages par immunofluorescence et immunoprécipitation. Ces essais sont bien connus dans l'art et les méthodes pour effectuer de tels essais ont été largement décrites.

Dans de tels modes de réalisation, la méthode de l'invention comprend une étape dans laquelle l'échantillon biologique est contacté avec un anticorps anti-aprotinine pendant un temps et dans des conditions permettant la formation d'un complexe anticorps-aprotinine entre l'anticorps ajouté et l'aprotinine présente dans l'échantillon biologique. De tels anticorps sont connus dans l'art et sont commercialement disponibles (par exemple, anticorps anti-aprotinine avec des spécificités épitopiques différentes comme IgG1k clones 9A508, 9A509 et 9A511, USBiological, Euromedex). Cette méthode utilise également un anticorps secondaire reconnaissant les complexes immuns et couplé à une enzyme, un agent chromogène ou un agent fluorogène permettant la détection. La quantité d'aprotinine présente dans l'échantillon biologique peut être déduite de la quantité de complexe formé.

La méthode de pronostic selon l'invention peut être utilisée pour sélectionner les animaux les plus tolérants dans le but de diffuser le caractère trypanotolérant au sein d'un troupeau. L'homme du métier appréciera qu'un pronostic de trypanotolérance peut être réalisé sur la base des seuls résultats obtenus par la méthode de l'invention. Cependant, un

vétérinaire peut également considérer d'autres paramètres comme des informations émanant de l'éleveur concernant la santé du bovin testé pendant une épidémie de trypanosomose.

Dans une variante de ce deuxième aspect, la présente invention fournit un kit pour le pronostic de la tolérance aux infections trypanosomiennes chez les bovins. Plus
5 spécifiquement, le kit comprend du matériel utile pour la réalisation d'un test de pronostic selon la méthode de l'invention. En général, un kit de l'invention comprend un anticorps spécifique de l'aprotinine, un réactif pour détecter un complexe anticorps-aprotinine formé entre l'anticorps et l'aprotinine présente dans un échantillon biologique (par exemple un anticorps secondaire reconnaissant les complexes immuns), et des instructions pour effectuer
10 la méthode de pronostic selon l'invention.

Selon la procédure, le kit peut comprendre en outre des réactifs ou solutions d'extraction, des réactifs ou solutions bloquants, des réactifs ou solutions de marquage, et/ou des moyens de détection. Des protocoles pour utiliser ces réactifs et/ou solutions peuvent être inclus dans le kit.

15 Les différents composants du kit peuvent être fournis sous forme solide (par exemple sous forme lyophilisée) ou sous forme liquide. Un kit peut éventuellement comprendre un récipient contenant chacun des réactifs ou solutions, et/ou des récipients pour réaliser certaines étapes de la méthode de pronostic (tubes à essais, plaques de titration, etc.).

Les instructions pour effectuer une méthode de pronostic selon l'invention peut
20 comprendre des instructions pour l'obtention et le traitement de l'échantillon biologique, des instructions concernant les différentes étapes de la méthode de pronostic et/ou des instructions pour interpréter les résultats. Un kit selon l'invention peut également comprendre une notice sous la forme prescrite par une agence gouvernementale régulant la préparation, la vente et l'utilisation de produits biologiques.

25 A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevet, tous les brevets et toutes autres références mentionnés ici sont incorporés par référence.

30 Les exemples suivants et les figures sont présentés pour illustrer certains modes de réalisation des procédures décrites ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

Exemples

Les inventeurs ont réalisé une étude globale du transcriptome par la technique Serial Analysis of Genes Expression (SAGE) des cellules sanguines d'animaux trypanotolérants (N'Dama et Baoulé) et trypanosensibles (Zébu) expérimentalement infectés par *Trypanosoma congolense*. L'étude de la cinétique de l'infection a permis de mettre en avant un certain nombre de gènes sur-exprimés, dont l'aprotinine. Concernant les transcrits de ce gène, ils ont observé une augmentation de leur nombre au moment où les parasites étaient les plus nombreux dans le sang des bovins trypanotolérants, alors qu'ils étaient quasiment indétectables chez l'animal trypanosensible. La différence avant infection et au moment où la parasitémie était maximale est significative ($P \text{ value} < 3. 10^{-4}$) et a permis aux inventeurs d'émettre l'hypothèse que le produit de ce gène pouvait avoir une incidence ou être, pour une partie, la conséquence du caractère de tolérance aux infections par les trypanosomes.

Exemple 1 : Détermination de l'Effet du BPTI sur le NO Macrophagique

Les macrophages jouent un rôle déterminant dans la réponse de l'hôte aux infections par des protozoaires. Ils sont impliqués dans la plupart des réponses inflammatoires et immunitaires. Au cours de la trypanosomose, les macrophages augmentent en nombre et en taille. Lors de l'activation macrophagique, une enzyme induite, la NO synthase, produit de larges quantités de monoxyde d'azote (NO). L'objectif de cette série d'expériences est de valider fonctionnellement la capacité du BPTI à induire une inhibition de la production de NO chez des macrophages murins et bovins, *via* son action sur la NO Synthase. Les effets du BPTI sur la production de NO ont été testés sur deux lignées macrophagiques murines (J774.2 et Raw 274.7) et sur des macrophages bovins dérivés de monocytes circulants.

1. Inhibition de la Production de NO par la Lignée Macrophagique J774.2

Deux ampoules différentes de la lignée J774.2 ont été utilisées au 8^{ème} et 9^{ème} passages. Les cellules de ces ampoules ont été mises en culture en parallèle, et les essais ont été tripliqués. Les cellules ont tout d'abord été stimulées avec du Lipopolysaccharide (LPS, InvivoGen) à une concentration de 100 ng/ml et avec de l'interféron gamma murin (IDN γ , AbD serotex) à une concentration finale de 10 ng/ml puis incubées en absence (contrôle) ou en présence de différentes concentrations de BPTI (gamme de 12,5 à 100 μ M) pendant 15 heures à 37°C / 5% CO₂ dans un milieu complet comprenant du DMEM glutamax (Gibco) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1% de pénicilline/streptomycine. La quantité de NO produite a été déterminée par dosage colorimétrique selon le principe de

Griess (Pinelli *et al.*, Vet. Parasitol., 2000, 92: 181-189). Pour chaque concentration de BPTI, le pourcentage d'inhibition de la production de NO est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{\text{concentration en NO (en } \mu\text{M) pour l'échantillon test}}{\text{concentration moyenne en NO (en } \mu\text{M) pour le contrôle}}$$

5 Les résultats obtenus, représentés sur les graphes **A** et **B** de la Figure 1, montrent l'action inhibitrice du BPTI sur la production de NO par les cellules de la lignée macrophagique J774.2. Cette inhibition croît en fonction de la dose d'aprotinine ajoutée et est proportionnelle à celle-ci. Lorsque les cellules sont stimulées, la quantité moyenne en NO produite est de 83,2 μM . Aux concentrations en BPTI de 12,5 μM , 25 μM , 50 μM et 100 μM , les inhibitions sont respectivement de 1,7%, 16,2%, 30,1% et 59,5%.

2. Inhibition de la Production de NO par la Lignée Macrophagique RAW 264.7

Deux ampoules différentes de la lignée RAW 264.7 ont été utilisées au 10^{ème} et 11^{ème} passages. Les cellules de ces ampoules ont été mises en culture en parallèle, et les essais ont été tripliqués et effectués comme décrit ci-dessus.

15 Les résultats obtenus, présentés sur les graphes **A** et **B** de la Figure 2, montrent l'action inhibitrice du BPTI sur la production de NO par les cellules de la lignée macrophagique RAW 264.2. Ici cependant, l'inhibition n'est pas linéaire en fonction de la dose de BPTI ajoutée comme observé dans le cas des cellules J744.2. Dans les cellules contrôles stimulées, la quantité moyenne en NO produite est de 90,1 μM . Aux concentrations en BPTI de 25 μM , 20 50 μM et 100 μM , les inhibitions sont respectivement de 0,2%, 16,1% et 47,6%. Aucune inhibition n'a été observée pour la concentration en BPTI de 12,5 μM .

3. Modèle Global de l'Effet du BPTI sur la Production de NO pour les 2 Lignées Cellulaires Murines

25 Pour chacune des lignées cellulaires murines il a été démontré que le numéro de passage des cellules n'a pas d'effet sur la concentration de NO (résultats non présentés). De même, un modèle basé sur l'effet conjoint de la concentration en BPTI et de la lignée cellulaire sur la concentration en NO a montré que cet effet conjoint n'était pas significatif (résultats non présentés). Le modèle suivant a également été utilisé pour étudier les effets inhibiteurs de BPTI sur la production de NO et l'effet de la lignée cellulaire:

$$30 \quad [\text{NO}]_i = [\text{NO}]_m + [\text{BPTI}]_i + \text{cell}_k + \epsilon_{ik}$$

dans lequel, $[NO]_i$ est la concentration en NO en μM observé dans les cellules incubées en présence de BPTI à la concentration $[BPTI]_i$; $[NO]_m$ est la concentration moyenne en NO en μM observée dans les cellules contrôles stimulées et recevant 12,5 μM de BPTI (la valeur basale est estimée pour 12,5 μM de BPTI en raison d'un effet non-linéaire entre 0 et 12,5 μM de BPTI pour la lignée RAW 264.7) ; $cell_k$ est la lignée cellulaire des cellules considérées (c'est-à-dire J774.2 ou RAW 264.7) ; et ϵ_{ik} représente les résidus du modèle supposés suivre une loi normale $N(0, \sigma^2)$.

Ce modèle conduit aux résultats présentés sur le graphe de la Figure 3 qui montre que l'effet estimé de la concentration en BPTI sur l'inhibition de la production de NO est extrêmement significatif ($P\text{-value} < 10^{-15}$) et est indépendant de la lignée cellulaire. La lignée cellulaire n'a d'effet que sur le niveau basal de NO après stimulation par LPS- $INF\gamma$.

4. Inhibition de la Production de NO par les Macrophages Bovins

Les monocytes bovins ont été isolés à partir des monocytes circulants. Deux essais indépendants ont été effectués, et chacun des essais est tripliqué. Les monocytes ont été stimulés avec du LPS à une concentration de 250 ng/ml et de l' $INF\gamma$ bovin à une concentration finale de 10 ng/ml. Les cellules ont ensuite été incubées en absence (contrôle) ou en présence de différentes concentrations de BPTI (12,5 à 100 μM) pendant 20 heures (essai 1) et 24 heures (essai 2) à 37°C / 5% CO_2 dans un milieu IMDM complet comprenant de l'IMDM additionné de L-glutamine à 2 nM final, de gentamycine à 50 $\mu g/ml$ final, de 10% de SVF et de b-mercaptoéthanol à 5×10^{-5} M.

a) Essai 1

Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes **A** et **B** de la Figure 4. Ils démontrent l'action inhibitrice du BPTI sur la production de NO par les macrophages bovins. Cette inhibition augmente en fonction de la dose de BPTI présente. Dans les cellules contrôles stimulées, la quantité moyenne en NO produite est de 11,5 μM . Aux concentrations en BPTI de 12,5 μM , 25 μM , 50 μM et 100 μM , les inhibitions moyennes induites par le BPTI sont respectivement de 8,4%, 14,2%, 32,6% et 70,5%.

Les résultats obtenus ont été étudiés avec le modèle suivant (voir graphe **C** de la Figure 4) :

$$[NO]_i = [NO]_m + [BPTI]_i + \epsilon_{ik}$$

dans lequel, $[NO]_i$ est la concentration en NO en μM observé dans les cellules incubées en présence de BPTI à la concentration $[BPTI]_i$; $[NO]_m$ est la concentration moyenne en NO en μM observé dans les cellules contrôles stimulées ; et ε_{ik} représente les résidus du modèle supposés suivre une loi normale $N(0, \sigma^2)$. L'effet de la concentration en BPTI sur l'inhibition de la production d'oxide nitrique NO par les macrophages bovins est extrêmement significatif (P -value $< 2 \times 10^{-16}$)

b) Essai 2

Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes **A** et **B** de la Figure 5. Ici encore, un effet inhibiteur du BPTI sur la production de NO par les macrophages bovins est observé. L'inhibition augmente en fonction de la dose de BPTI présente. Dans les cellules contrôles stimulées, la quantité moyenne en NO produite est de 5,43 μM . Aux concentrations en BPTI de 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM et 100 μM , les inhibitions moyennes induites par le BPTI sont respectivement de 12%, 25,9%, 62,5%, 70%, et 60,2%. Dans cet essai, l'inhibition n'est proportionnelle aux doses de BPTI qu'entre 6,25 et 50 μM . Les résultats obtenus ne peuvent pas être étudiés par un modèle simple. Ils nécessitent l'utilisation d'un modèle polynomial (voir graphe C de la Figure 5).

5. Conclusion sur l'Inhibition de la Production de NO par BPTI

La molécule de BPTI présente une activité inhibitrice extrêmement significative (P value $< 2.10^{-16}$) sur la production de NO par les lignées de macrophages murins mais également sur celle de macrophages bovins issus de monocytes circulants. Dans tous les cas, un effet dose-dépendant a été observé. C'est sur les macrophages bovins que les inhibitions les plus fortes ont été observées. Le BPTI est une molécule bovine, il n'est donc pas surprenant que son action soit plus efficace sur des cellules de la même espèce. La molécule de BPTI ayant la capacité d'inhiber la synthèse de NO, elle pourrait induire l'activation des macrophages alternatifs et s'opposer aux processus inflammatoires aigus.

Exemple 2 : Effets du BPTI sur la Viabilité et la Croissance Parasitaires

1. Effet du BPTI sur la Viabilité de *Trypanosoma congolense* IL1180

a) Observations Microscopiques

Les premières observations microscopiques ont permis de rendre compte de l'effet du BPTI sur la morphologie parasitaire (voir Figure 6). Avant ajout de BPTI et pour les temps de mesure de 1,5 heures, 17 heures et 24 heures, les parasites (*Trypanosoma congolense*

IL1180) sont bien visibles ; leur forme est celle attendue (fusiforme), et ils sont mobiles. Cependant la mortalité devient de plus en plus visible avec le temps. L'impact de BPTI sur la morphologie est perceptible 17 heures (et au-delà) après ajout du BPTI à la culture. Des formes sphériques sont observées qui sont caractéristiques d'un état de stress des parasites.

5 **b) Viabilité du *Trypanosoma congolense* IL1180 Mesurée par FACS**

Dans le but d'analyser l'effet du BPTI sur la viabilité parasitaire, des mesures en cytométrie de flux ont été réalisées à différents temps (1,5 heure, 17 heures, 24 heures et 48 heures après ajout de 100 μM ou 200 μM de BPTI pour des concentrations en parasites de 5×10^6 parasites/mL et 10×10^6 parasites/mL). Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes **A** et **B** de la Figure 7.

Il existe une mortalité « naturelle » de *Trypanosoma congolense in vitro*, car le maintien en culture liquide est difficile avec les formes sanguicoles de *Trypanosoma congolense*. Cette mortalité croît en fonction du temps et atteint des valeurs de 49,1% et 47,1% respectivement dans les conditions utilisant $5 \cdot 10^6$ parasites/mL et $10 \cdot 10^6$ parasites/mL. Cependant, il est possible d'observer une action trypanocide du BPTI sur les cultures de trypanosomes, et de noter un léger effet dose-dépendant du BPTI sur la viabilité parasitaire. L'effet du BPTI est extrêmement significatif et semble être également dépendant du temps. Une fois la mortalité naturelle soustraite, on trouve que des concentrations en BPTI de 100 μM et 200 μM induisent respectivement 46% et 47,4% de mortalité à 48 heures sur une population de $2,5 \times 10^6$ trypanosomes (5×10^6 parasites/mL). La mortalité induite par BPTI sur une population de 5×10^6 trypanosomes (10×10^6 parasites/mL) dans les mêmes conditions est respectivement 49,6% et 48,8% (voir graphes **A** et **B** de la Figure 8).

c) Analyses Statistiques des Résultats Obtenus

Les inventeurs ont modélisé les effets de la concentration en BPTI, du temps, de la concentration en trypanosomes et de la date de l'expérimentation sur la mortalité des trypanosomes. Sachant que la mortalité des trypanosomes a été mesurée au cours du temps au sein de la même cupule et considérant qu'il pouvait exister une variation aléatoire de la mortalité des trypanosomes entre les cupules, un modèle linéaire mixte a été utilisé. Ce modèle capte les corrélations dues à la répétition intra-cupule des mesures, et qui considère les cupules comme tirées au sort au sein d'une population suit une loi normale $N(0, \sigma_c^2)$.

Le test des effets de l'ensemble des variables et des interactions possibles entre celles-ci a montré que l'effet « concentration en trypanosomes » et ses différentes interactions ne sont

pas significatifs. Par contre la date d'expérimentation a un effet significatif sur la mortalité des trypanosomes. Ceci n'est pas étonnant puisqu'il s'agit de différents cryostables de trypanosomes, décongelés à des dates différentes, et pouvant donc posséder des viabilités propres en fonction des conditions de décongélation. L'interaction entre la concentration en BPTI et le temps de la mesure (après ajout de BPTI) est très significative et positive (voir Figure 9). En raison de cette interaction, l'effet du BPTI pour chaque valeur du temps de mesure a été étudié. Pour l'ensemble des conditions, il a été trouvé que l'effet du BPTI sur la mortalité est extrêmement significatif ($P\text{-value} < 10^{-4}$) et il augmente avec le temps.

2. Effet du BPTI sur la Viabilité de *Leishmania Donovanii infantum* (Ldi)

a) Viabilité et Croissance Mesurées par FACS

La croissance et la viabilité des parasites *Leishmania Donovanii infantum* ont été mesurées par FACS à 4, 12, 24, 48, 72, 144 et 168 heures de cultures après ajout de BPTI à des concentrations de 50, 100 et 200 μM . Les résultats sont présentés sur les graphes **A** et **B** de la Figure 10.

b) Analyses Statistiques des Résultats Obtenus

Etude de l'Effet du BPTI sur la Viabilité des Leishmanies : L'observation graphique des résultats (graphe A de la Figure 10) montre une relation non-linéaire entre le temps et la viabilité : la viabilité croît jusqu'à 144 heures puis semble décliner ensuite. L'effet du BPTI a été testé pour chaque valeur du temps avec un test non paramétrique (test de Kruskal-Wallis). Ce test montre un effet significatif du BPTI sur la viabilité des leishmanies pour les temps 168 heures ($P\text{-value} = 0,03$) et 144 heures ($P\text{-value} = 0,05$) et à la limite de la significativité pour 72 heures ($P\text{-value} = 0,05$) ; l'effet est non significatif pour les autres temps d'observation.

Etude de l'Effet du BPTI sur la Croissance des Leishmanies : Comme pour la viabilité des leishmanies, le graphe **B** de la Figure 10, qui représente le nombre de leishmanies (en \log_{10}) en fonction du temps, pour différentes concentrations en BPTI, montre une relation non-linéaire entre la croissance de la population de leishmanies et les variables explicatives. En testant l'effet du BPTI pour chaque valeur du temps avec un test non paramétrique (test de Kruskal-Wallis), un effet significatif du BPTI sur le nombre de leishmanies a été démontré seulement pour le temps 168 heures ($P\text{-value} = 0.03$).

3. Conclusion sur l'Effet du BPTI sur la Viabilité et la Croissance Parasitaires

Les résultats obtenus montrent que le BPTI présente une action trypanocide et leishmanicide. Pour le *Trypanosoma congolense*, la mortalité est significative quel que soit le

temps de mesure (P -value $< 10^{-4}$). Pour les leishmanies, la viabilité n'est affectée qu'au bout de 72 heures de contact. Une action significative (P -value = 0,03) sur la croissance des leishmanies n'est observée qu'au bout de 168 heures de contact.

Exemple 3 : Effets du BPTI sur l'Activité Enzymatique de Lysats Parasitaires

5 Les molécules produites, excrétées ou sécrétées par le parasite, ont une incidence importante sur la pathologie des trypanosomoses. Des molécules ont déjà été identifiées comme jouant un rôle majeur dans la pathologie. C'est la cas de protéases parasitaires comme la congopaine, une cystéine protéase trypanosomale de 33 kDa retrouvée dans la circulation systémique des bovins infectés par *Trypanosoma congolense* (Authié *et al.*, Int. J. Parasitol., 2001, 31: 1429-1433). C'est aussi le cas de l'Oligopeptidase B (OP-Tc), une sérine
10 protéase trypanosomale également retrouvée dans la circulation sanguine (Morty *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 1999, 102: 145-155), mais qui, contrairement à la congopaine, est libérée en faveur d'une lyse parasitaire induite par les réponses de l'hôte. Cette enzyme n'est pas dégradée, elle conserve une activité catalytique importante détectable dans le sérum des
15 animaux infectés (Troeborg *et al.*, Eur. J. Biochem., 1996, 238: 728-736).

L'objectif de cette série d'expériences est de déterminer si le BPTI peut avoir une action sur l'activité enzymatique des lysats parasitaires.

1. Effet du BPTI sur les Lysats de *Trypanosoma congolense* (Tc. IL1180)

Les parasites ont été mis en culture sur rongeur puis purifiés sur colonne DEAE
20 cellulose. Les parasites ont ensuite été dénombrés, puis lysés par 4 passages successifs de 1 minute dans de l'azote liquide puis dans un bain-marie à 37°C. Les tests ont été réalisés sur trois manipulations indépendantes en triplicates en utilisant 2×10^6 parasites. La méthode de détection de l'activité de type « trypsin-like » (sérine protéase) consiste à mesurer, en fonction du temps, la vitesse initiale de dégradation d'un substrat homogène, le N-benzoyl-arginine-p-nitroaniline (BAPNA), sous l'effet des protéases « trypsin-like » présentes dans les lysats en
25 présence ou en absence de BPTI. L'apparition du produit de dégradation, le p-nitroalanine (p-Na), de coloration jaune, est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. Le calcul de l'activité enzymatique est effectué selon la loi de Beer-Lambert.

Les graphes de la Figure 11 présentent la cinétique de dégradation du substrat (BAPNA, 0,315 mM) en présence ou non de BPTI (3,125 mg/mL soit 481,25 μ M ou 625 μ g/puits).
30 L'activité du lysat initial est de 1,893 (Ecart type 0,076) contre 1,048 (Ecart type 0,073) en présence de BPTI, soit une inhibition moyenne de 44,6%. L'utilisation du test non-

paramétrique de Kruskal-Wallis démontre un effet très significatif du BPTI sur l'activité enzymatique du lysat parasitaire (Chi-Deux de Kruskal-Wallis: 14,5 ; Degré de liberté: 1 ; P value = 0,0001).

2. Effet du BPTI sur les Lysats de *Leishmania donovani infantum* (Ldi et Ldd8)

5 Les leishmanies (*Ldi* et *Ldd8*) ont été mises en culture dans du milieu RMPI additionné de 10% de SVF, de 1% de pénicilline/stréptomycine et de 1% d'Ultraglutamine et placées en étuve à 37°C / 5% CO₂ pendant une semaine. Les leishmanies sont comptées puis lysées suivant le protocole établi pour la lyse des trypanosomes. La méthode de détection et le calcul de l'activité enzymatique sont identiques à ceux utilisés pour les trypanosomes. Les tests utilisant *Ldi* et *Ldd8* ont été réalisés sur trois manipulations indépendantes et tripliquées en utilisant 2×10^6 parasites.

a) Inhibition de l'Activité Enzymatique d'un Lysat de *Ldi*

Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes de la Figure 12. L'activité dans le lysat seul est de 2,893 contre 1,555 avec le BPTI soit une inhibition de l'activité de 46,3%. L'utilisation du test non-paramétrique de Kruskal-Wallis démontre un effet très significatif du BPTI sur l'activité enzymatique du lysat parasitaire (Chi-Deux de Kruskal-Wallis : 12,91; Degré de liberté : 1 ; p value= 0,0003).

b) Inhibition de l'Activité Enzymatique d'un Lysat de *Ldd8*

Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes de la Figure 13. L'activité dans le lysat seul est de 1,767, contre 1,0.893 avec le BPTI soit une inhibition de l'activité de 49,5%. L'utilisation du test non-paramétrique de Kruskal-Wallis démontre un effet très significatif du BPTI sur l'activité enzymatique du lysat parasitaire (Chi-Deux de Kruskal-Wallis : 13.37; Degré de liberté : 1 ; p value=0.0003).

3. Conclusion sur l'Effet du BPTI sur l'Activité Enzymatique de Lysats Parasitaires

25 Une diminution de l'activité enzymatique a été observée sur l'ensemble des lysats parasitaires utilisés. Le BPTI entraîne une chute significative respective de 44,6%, 46,3% et 49,5% de l'activité enzymatique de *Trypanosoma congolense* (P value 0,0001), de *Leishmania donovani donovani* (P value 0,0003) et de *Leishmania donovani infantum* (P value 0,0002). L'action du BPTI sur l'activité enzymatique de lysat de ces parasites est donc bien établie.

Les protéases ont une place importante chez les parasites (McKerrow *et al.*, Annu. Rev. Pathol., 2006, 1: 497-536). Leurs fonctions et leurs rôles sont variés. Chez les trypanosomes, les principales enzymes protéolytiques sont des cystéine protéases et des sérine protéases (Mbawa *et al.*, Eur. J. Biochem., 1992, 204: 371-379; Troeberg *et al.*, Eur. J. Biochem., 1996, 5 238: 728-736). Comme mentionné plus haut, l'implication de ces enzymes dans la sévérité de la maladie a été souvent évoquée (Boulangé *et al.*, Int. J. Parasitol., 2001, 31: 1435-1440; Authié *et al.*, Int. J. Parasitol., 2001, 31: 1429-1433; Authié, Parasitol. Today, 1994, 10: 360-364; Authié *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., 1992, 56: 103-116)

Les résultats obtenus montrent que la BPTI pourrait contrecarrer les effets pathogènes
10 des protéases parasitaires lors de l'infection.

Revendications

1. Aprotinine pour son utilisation dans le traitement d'une maladie ou infection parasitaire animale provoquée par un protozoaire et affectant les mammifères, en particulier les mammifères domestiqués.
- 5 2. Aprotinine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale affecte les mammifères du groupe constitué des bovidés, des caprins, des ovins et des buffles, et affecte préférentiellement les bovins.
3. Aprotinine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est provoquée par un protozoaire flagellé.
- 10 4. Aprotinine selon la revendication 3, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est un membre du groupe constitué des trypanosomiasés, des leishmaniosés, des lambliares, et des trichomonoses.
5. Aprotinine selon la revendication 3, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est provoquée par un protozoaire flagellé de la famille des
15 *Trypanosomatidae*.
6. Aprotinine selon la revendication 5, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est provoquée par un protozoaire flagellé appartenant au genre *Trypanosoma*.
7. Aprotinine selon la revendication 6, caractérisée en ce que la maladie ou infection
20 parasitaire animale est provoquée par un trypanosome du groupe constitué de *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma brucei* et *Trypanosoma vivax*.
8. Aprotinine selon la revendication 5, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est provoquée par un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*.
- 25 9. Aprotinine selon la revendication 8, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est provoquée par une leishmania du groupe constitué de *Leishmania donovani donovani* et *Leishmania donovani infantum*.
10. Aprotinine selon la revendication 2, caractérisée en ce que la maladie ou infection
30 parasitaire animale affectant les bovins est un membre du groupe constitué de la trypanosomiose bovine, la lambliaire bovine, la trichomonose bovine, la babésiose

bovine, la besnoitiose bovine, la néosporose bovine, la thélériose bovine, la toxoplasmose bovine, la cryptosporidiose bovine, la sarcocysse bovine et la coccidiose bovine.

- 5 11. Utilisation d'aprotinine selon l'une quelconque des revendications précédentes pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'une maladie ou infection parasitaire animale provoquée par un protozoaire.
12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que la maladie ou infection parasitaire animale est un membre du groupe constitué des trypanosomiases, des leishmanioses, des lamblases, et des trichomonoses.
- 10 13. Aprotinine pour son utilisation comme biomarqueur de la trypanotolérance bovine.
14. Méthode *in vitro* pour le pronostic de la tolérance aux infections trypanosomiennes chez un bovin comprenant une étape de détermination de la quantité d'aprotinine dans un échantillon biologique obtenu du bovin à tester.
- 15 15. Méthode selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'étape de détermination de la quantité d'aprotinine comprend l'utilisation d'une méthode de dosage immunologique, en particulier un ELISA.
- 20 16. Méthode selon la revendication 14 ou la revendication 15, caractérisée en ce que l'échantillon biologique est du sang ou du sérum.

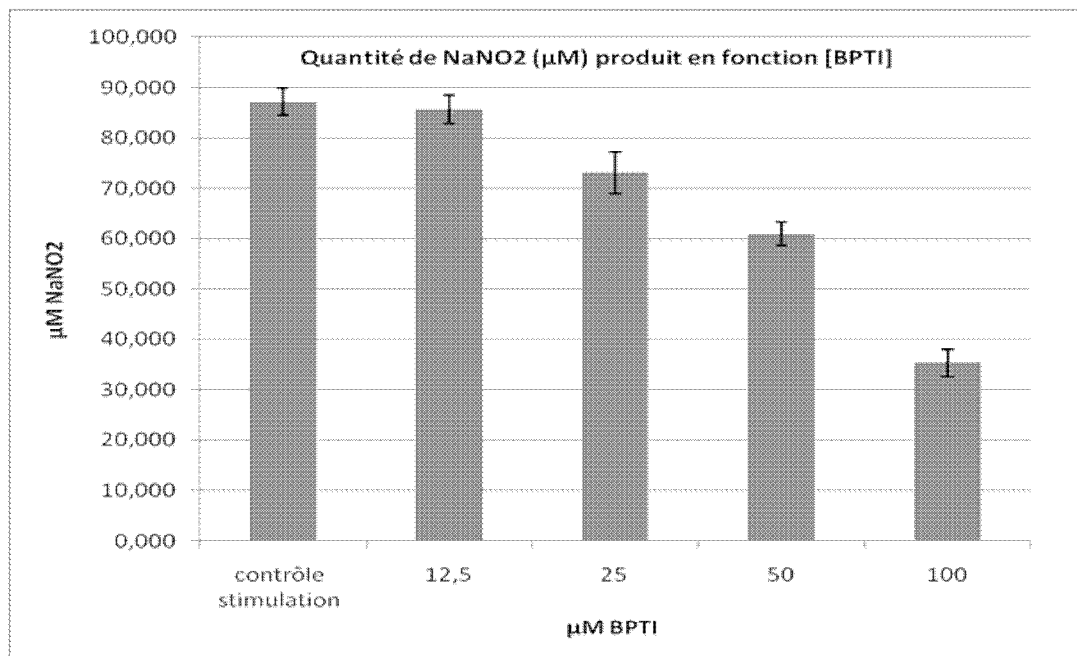
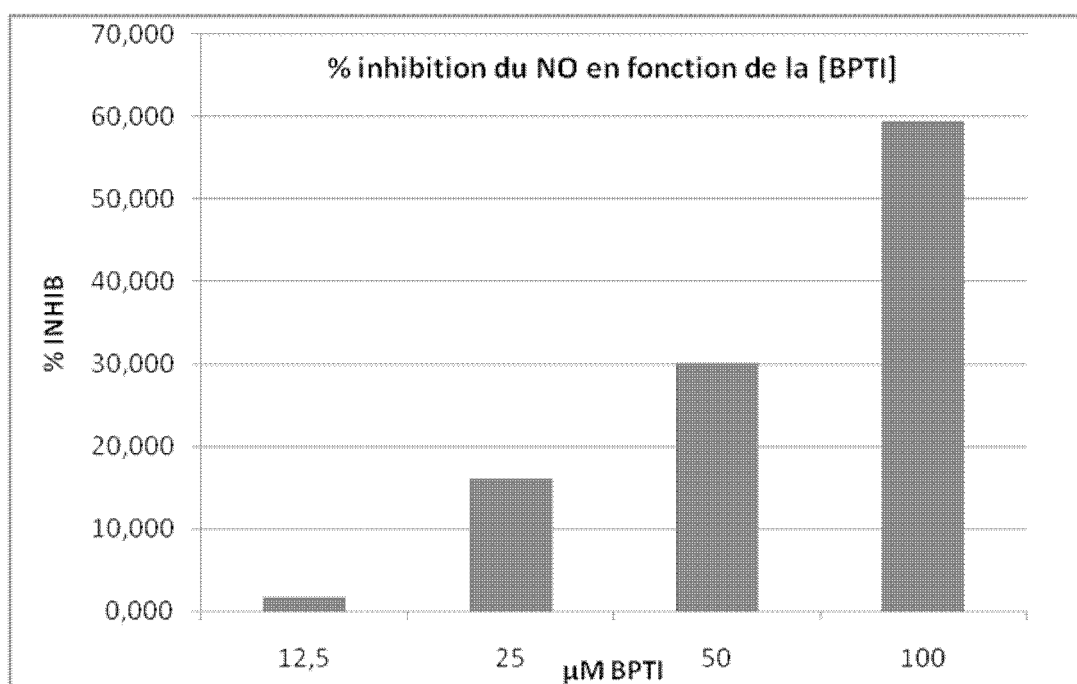
Figure 1 / 13**A****B**

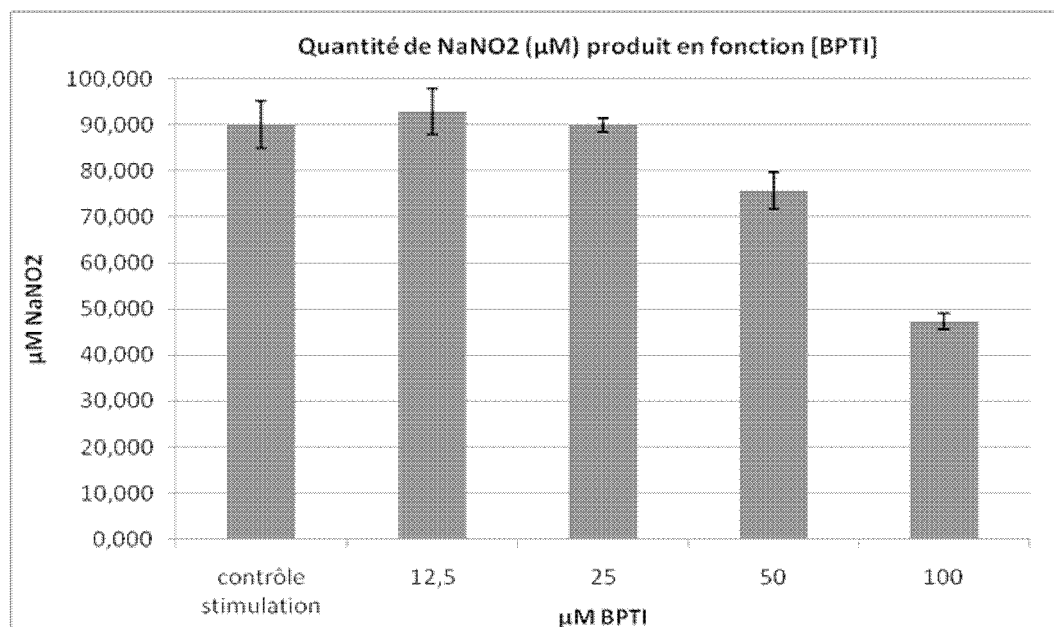
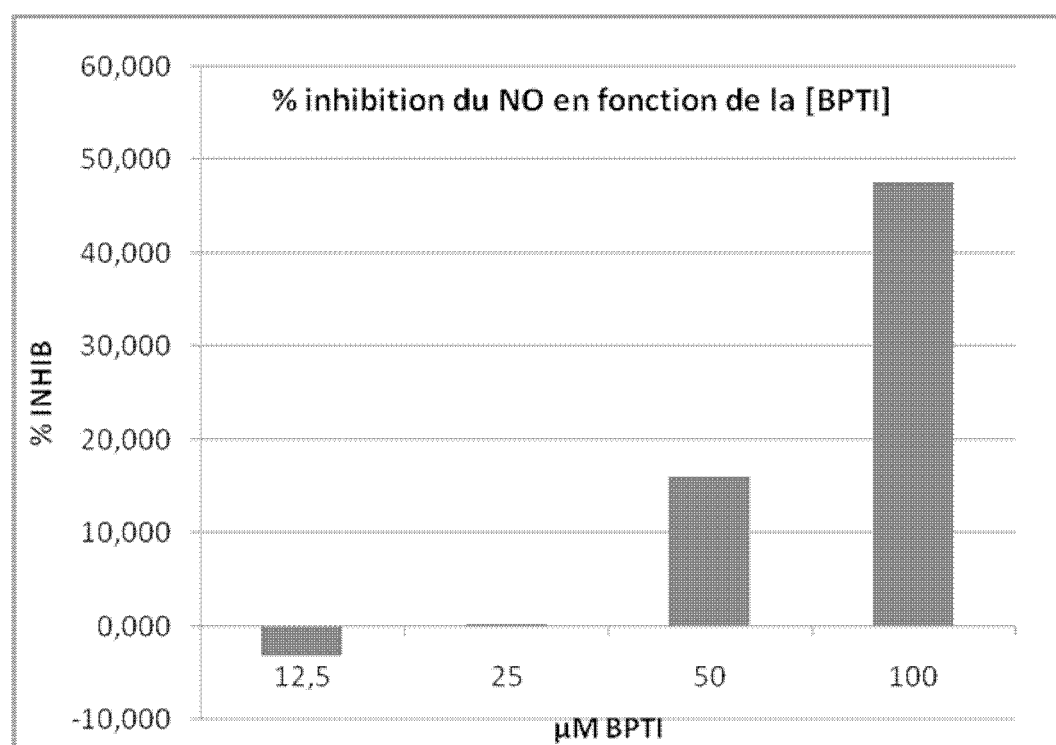
Figure 2 / 13**A****B**

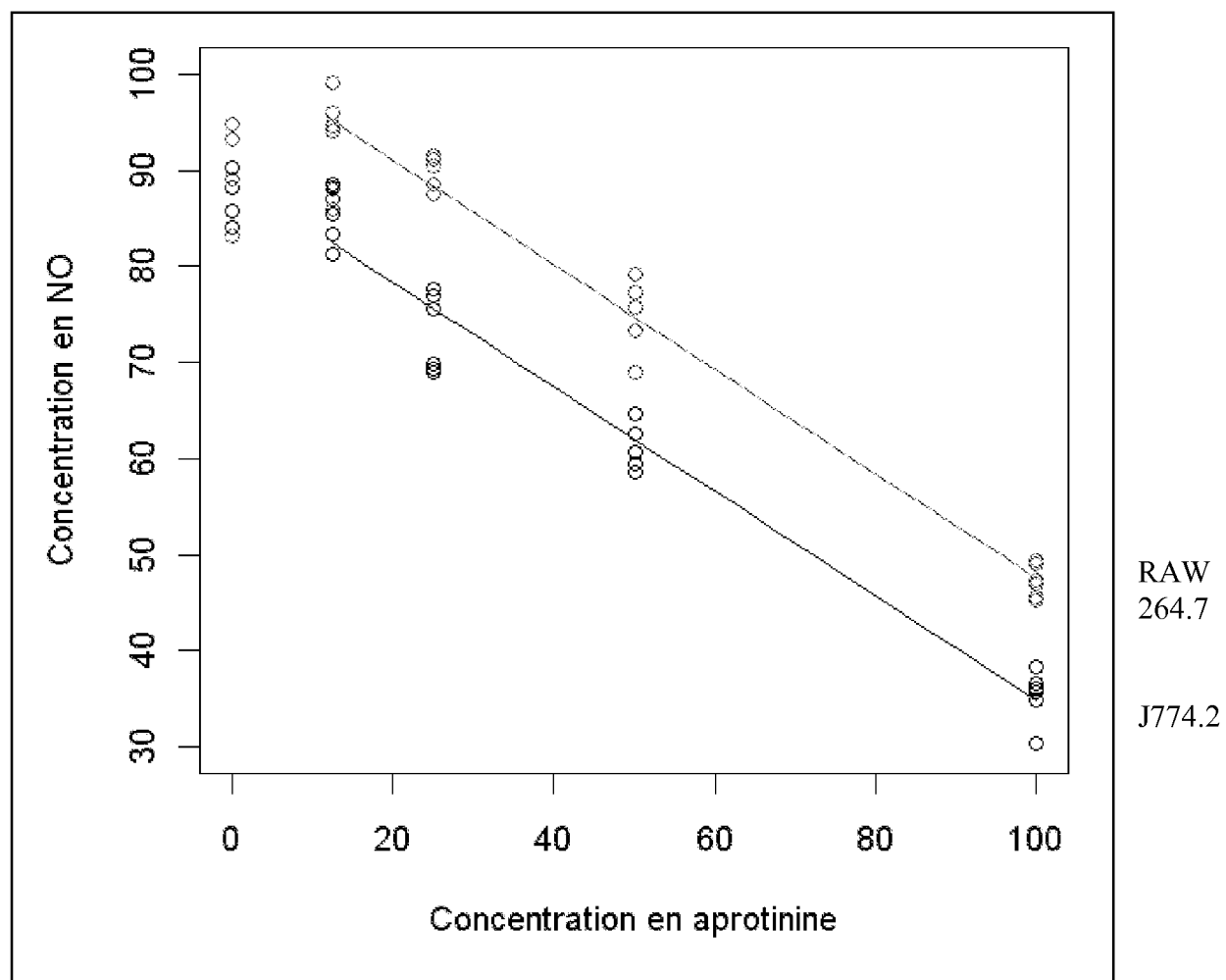
Figure 3 / 13

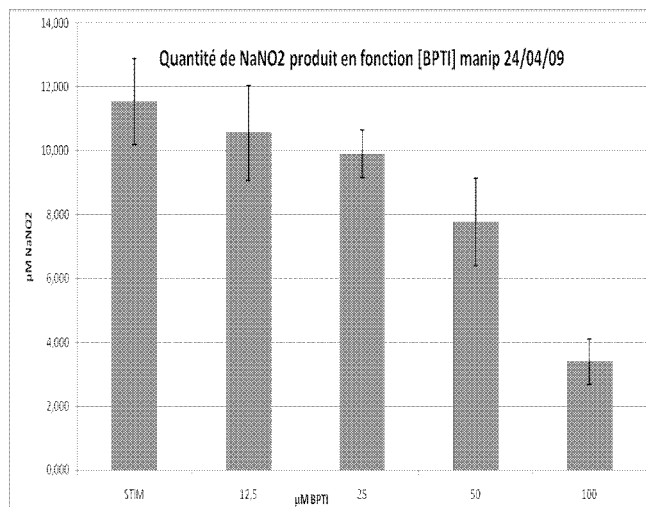
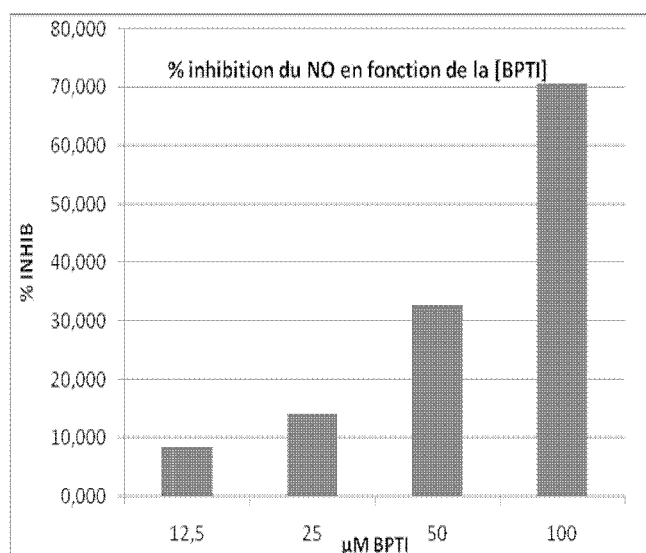
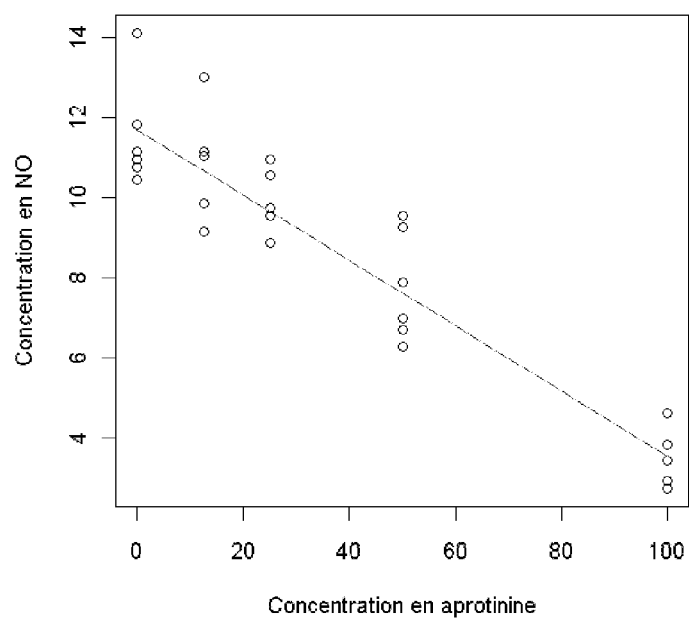
Figure 4 / 13**A****B****C**

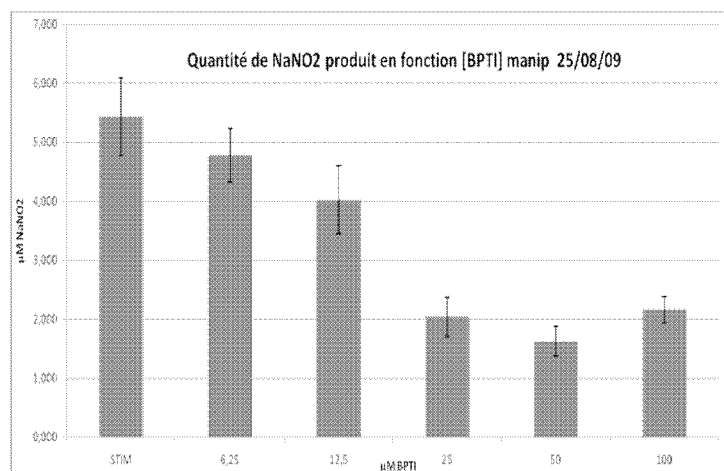
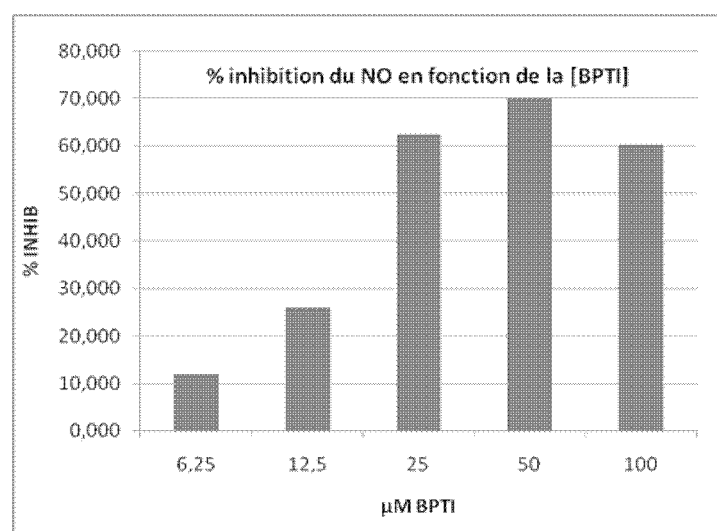
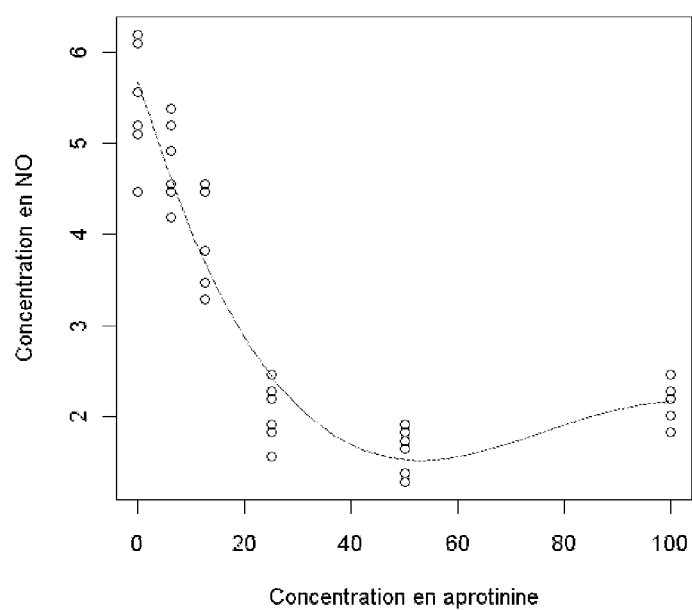
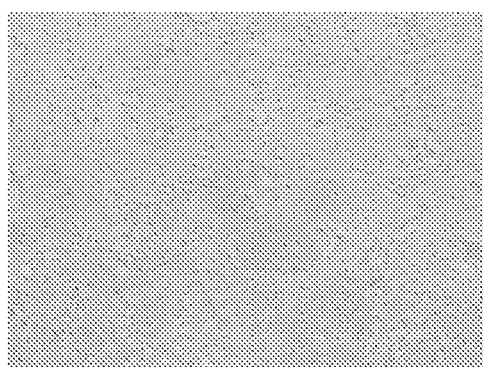
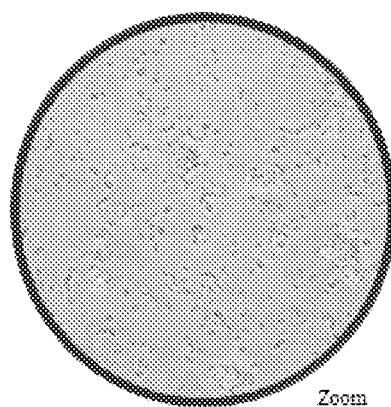
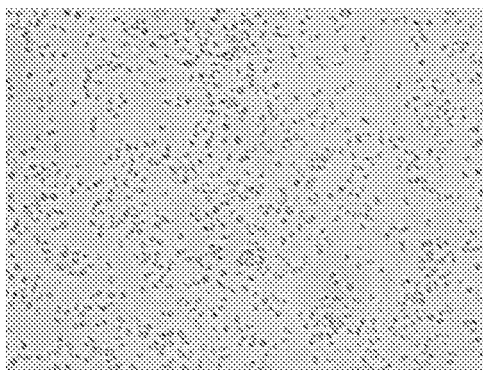
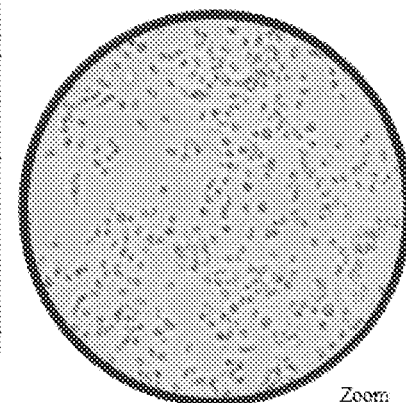
Figure 5 / 13**A****B****C**

Figure 6 / 13**A**

a. condition sans BPTI



Zoom

Bb. condition avec 200 μ M de BPTI

Zoom

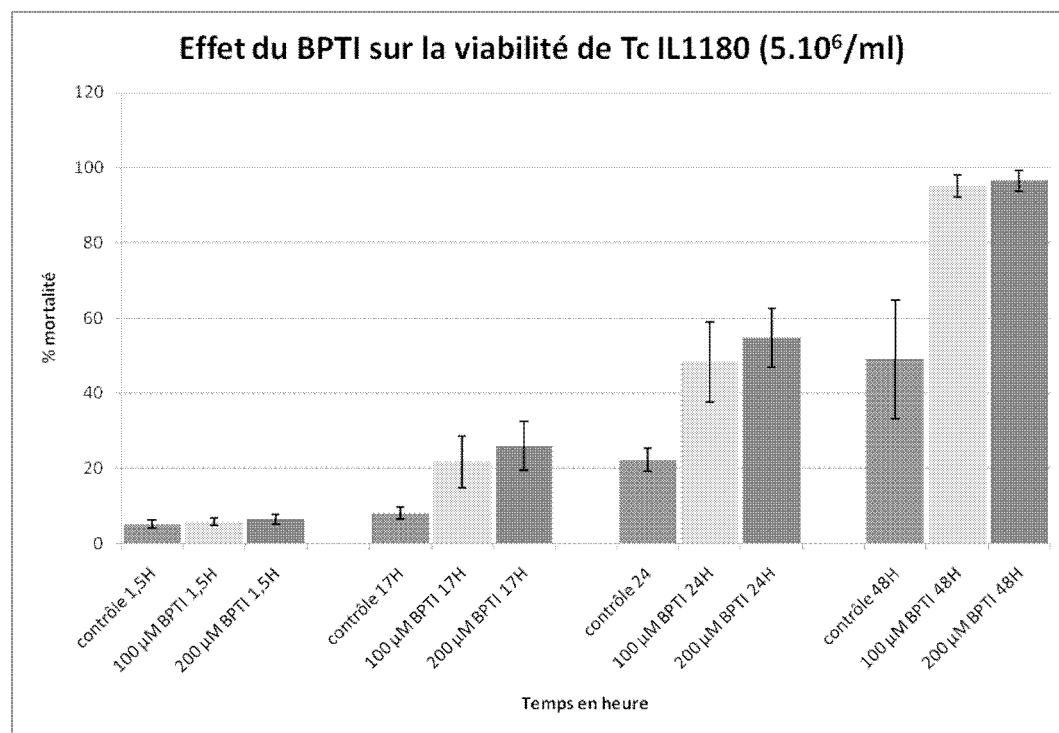
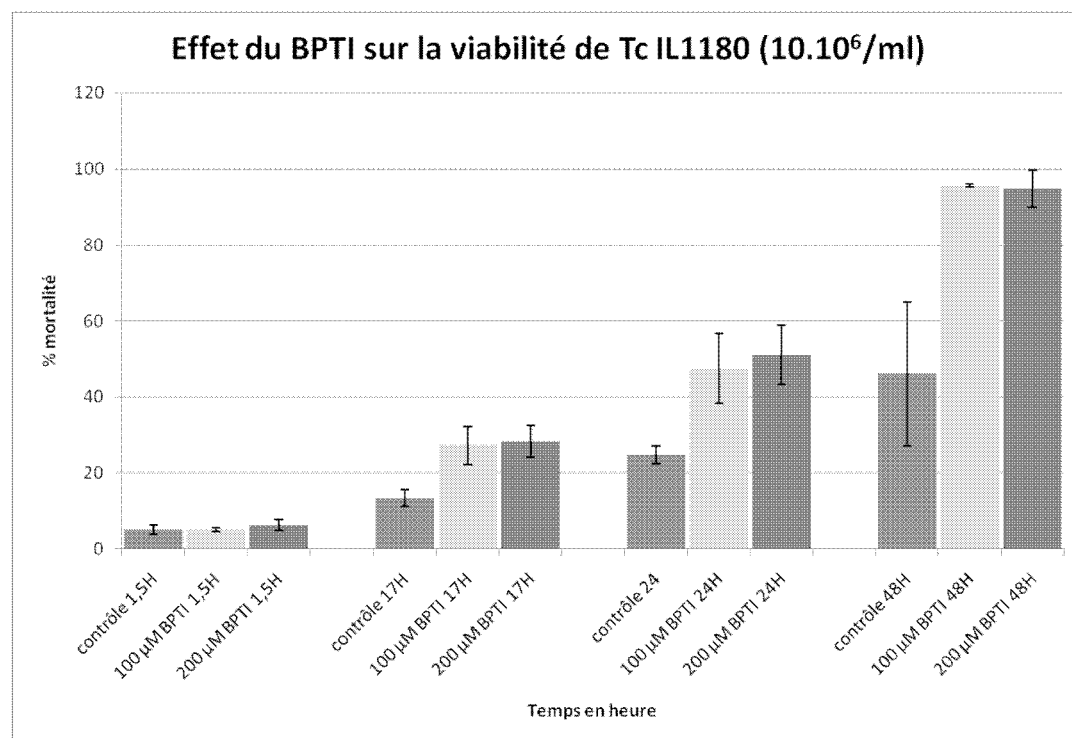
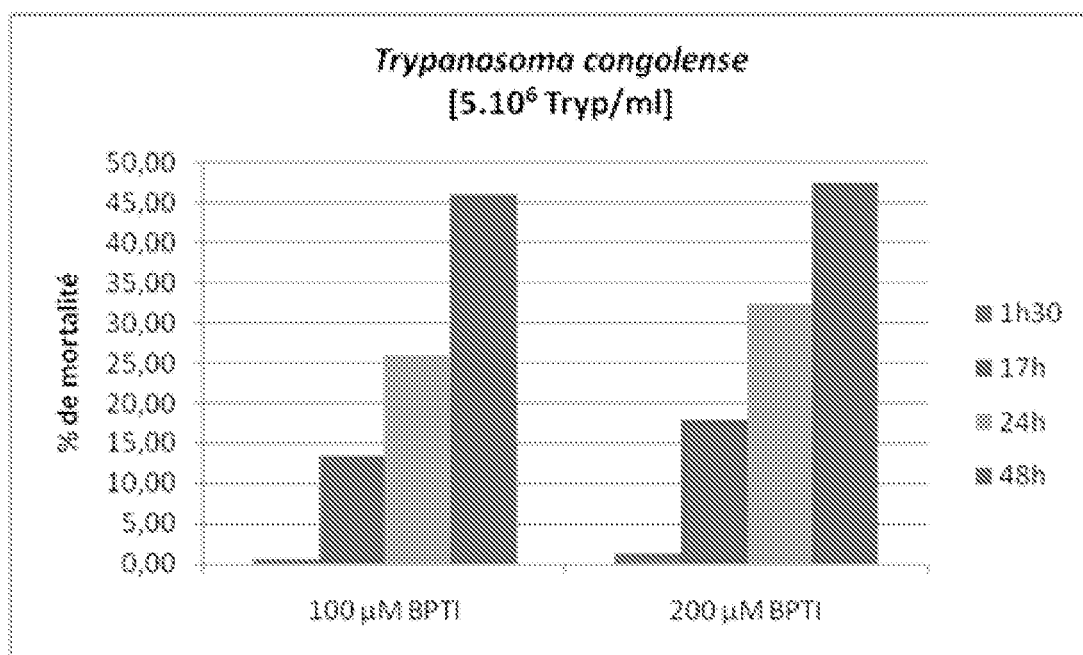
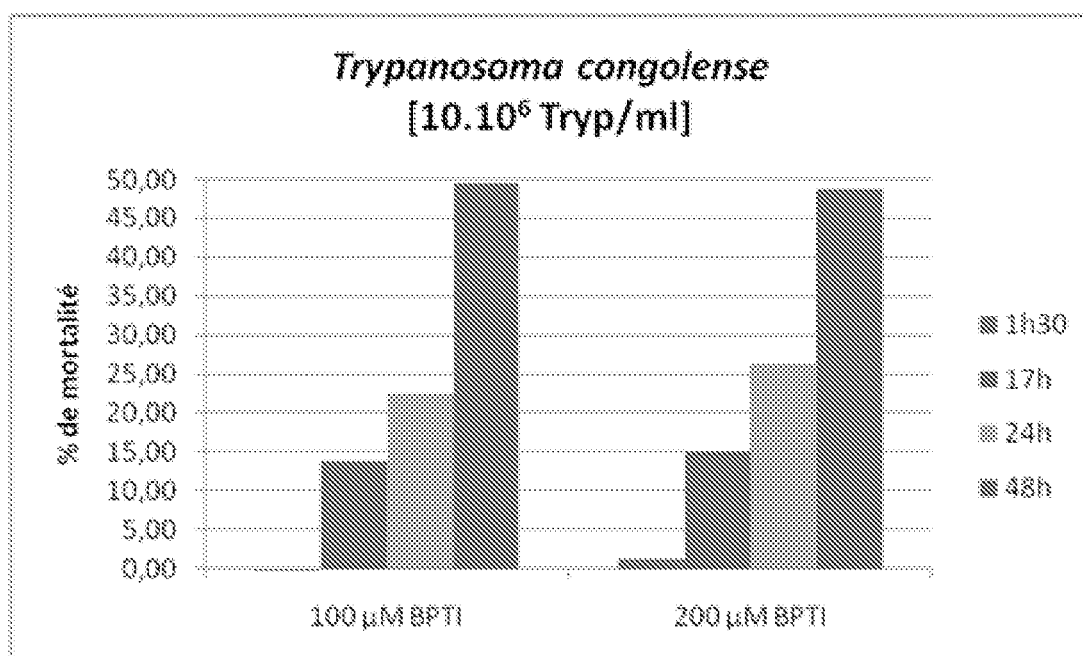
Figure 7 / 13**A****B**

Figure 8 / 13**A****B**

2955496

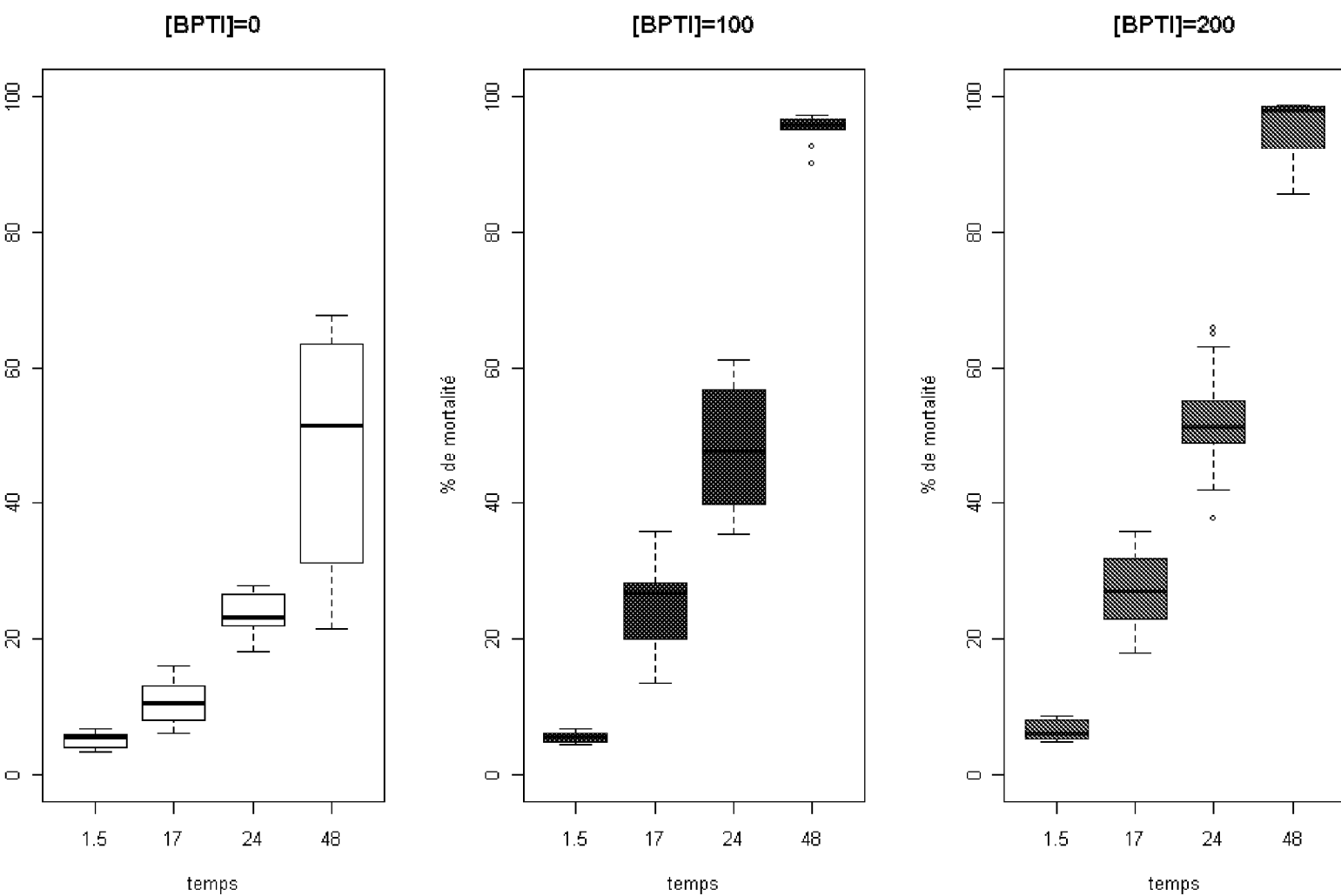


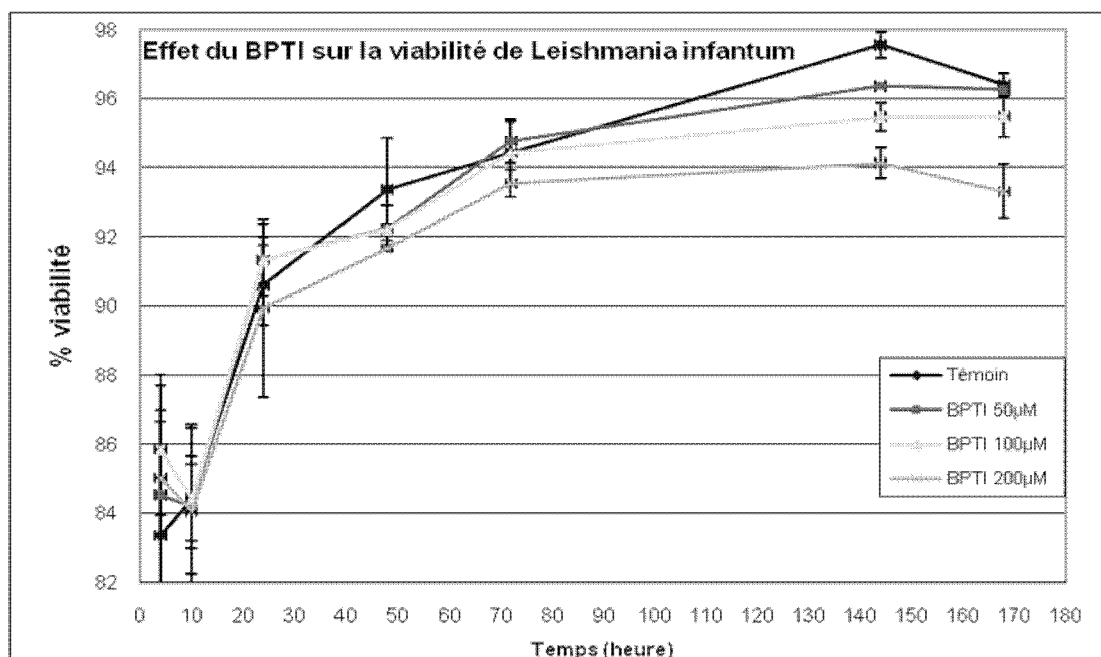
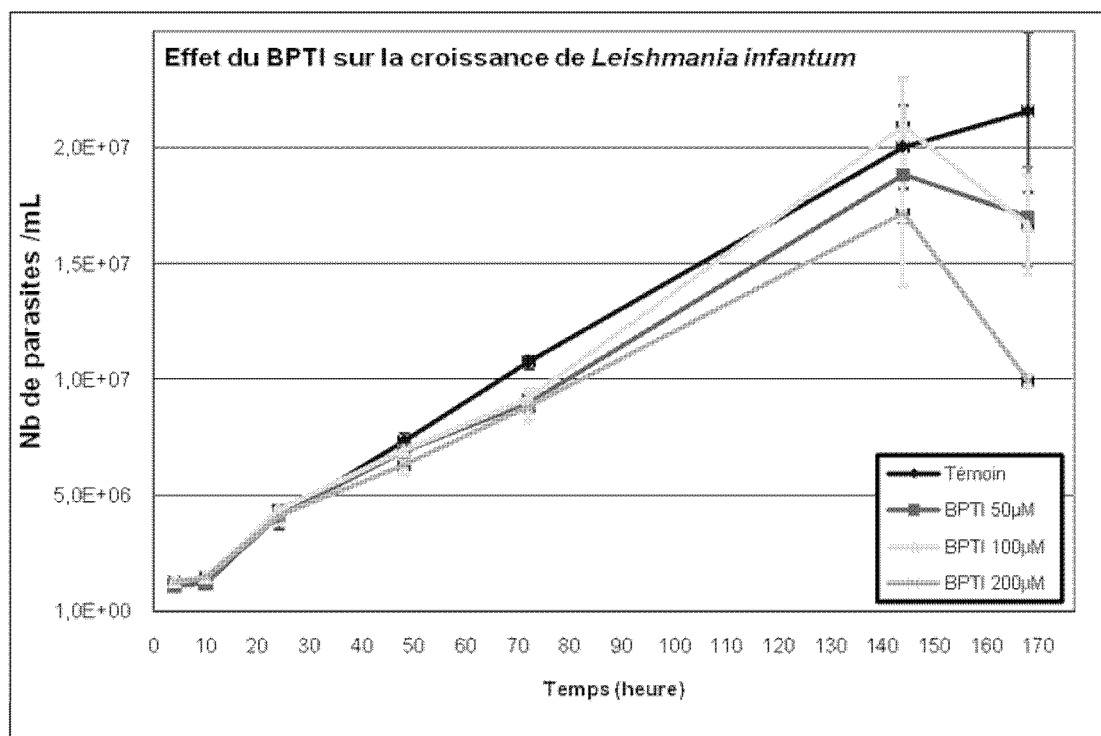
Figure 10 / 13**A****B**

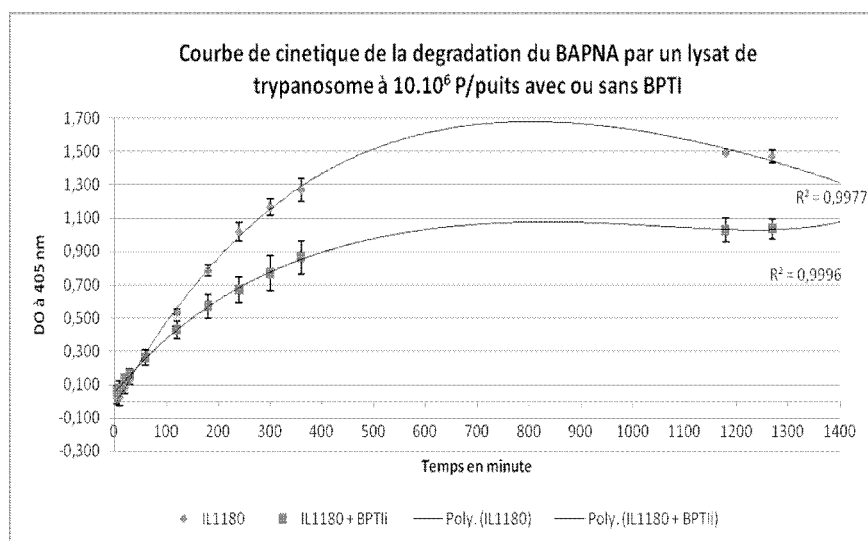
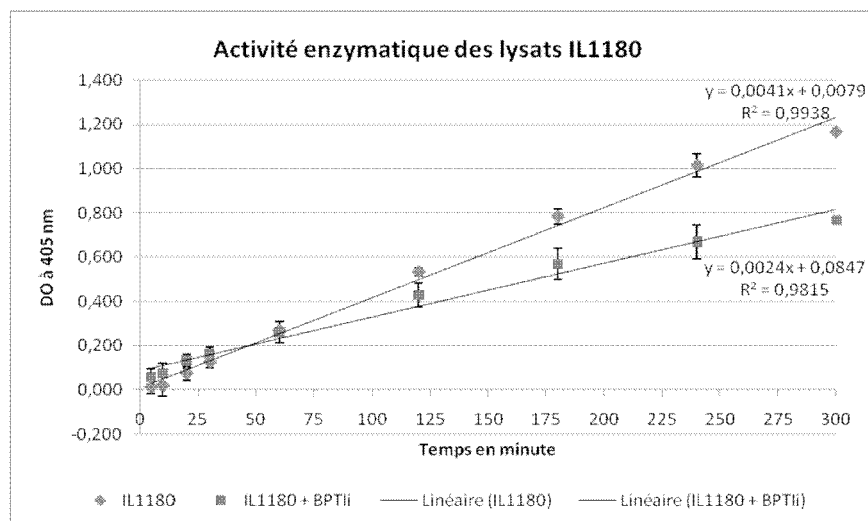
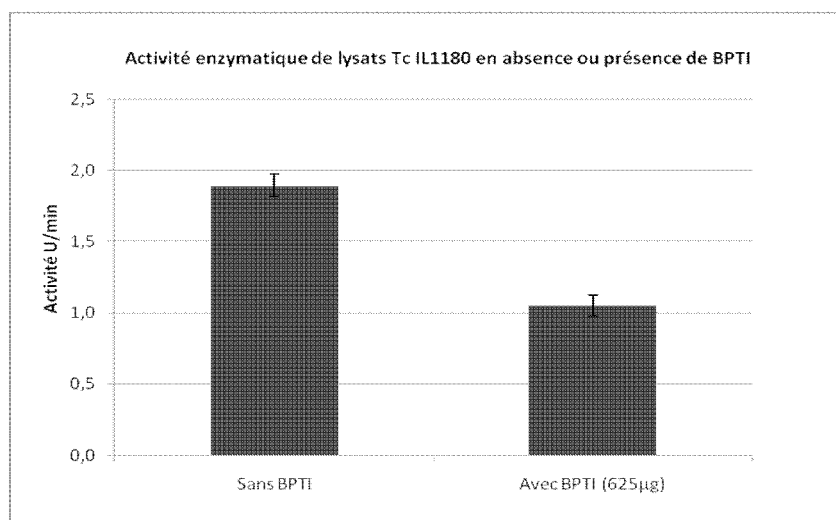
Figure 11 / 13**A****B****C**

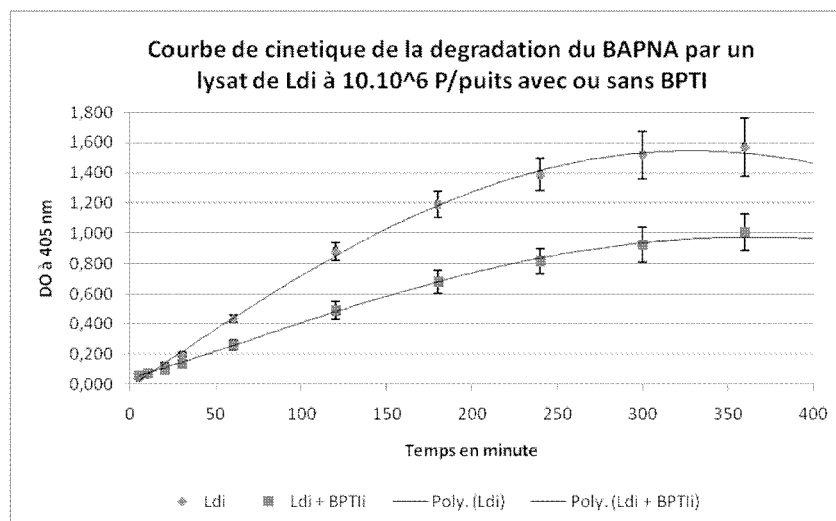
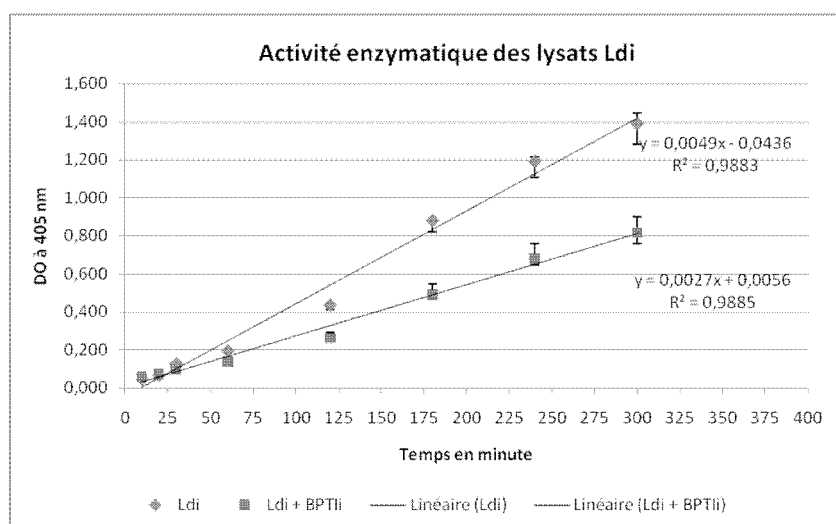
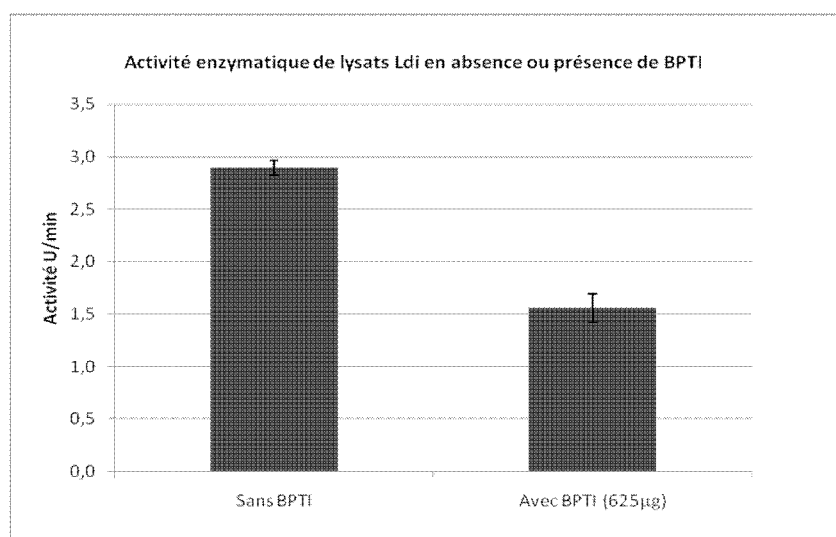
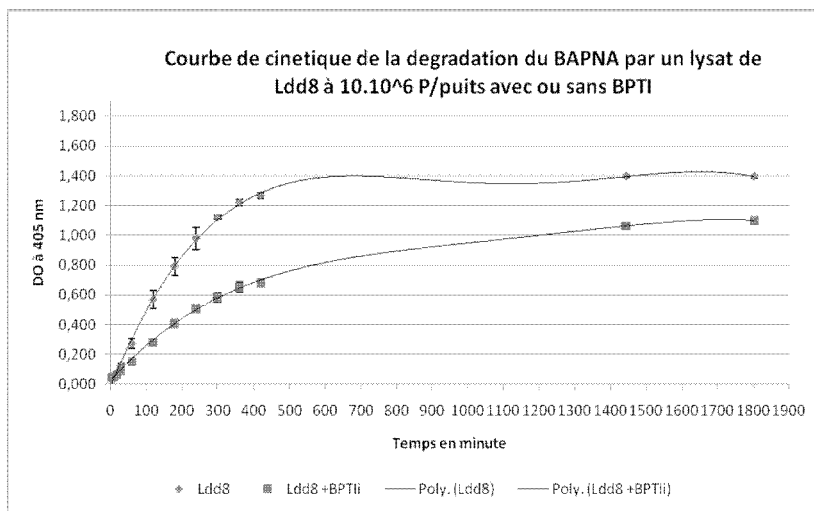
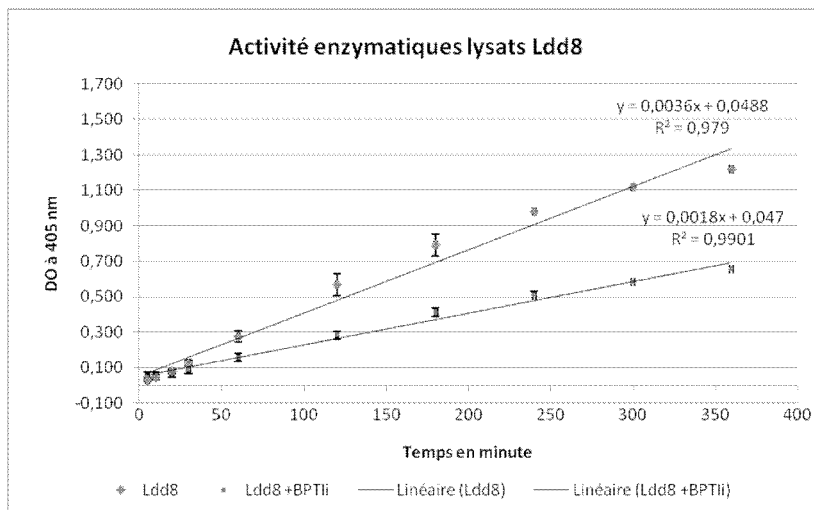
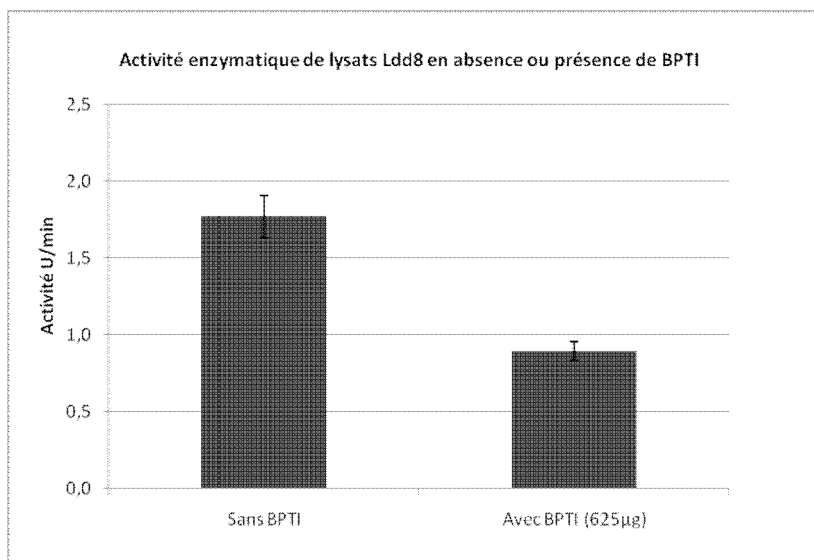
Figure 12 / 13**A****B****C**

Figure 13 / 13**A****B****C**

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

US 2009/074783 A1 (LOBO CHERYL [US] ET AL)
19 mars 2009 (2009-03-19)

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US;
1990, FULLER A L ET AL: "REDUCTION IN CELL ENTRY OF EIMERIA-TENELLA COCCIDIA
SPOROZOITES BY PROTEASE INHIBITORS AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF
PROTEOLYTIC ACTIVITY ASSOCIATED WITH INTACT SPOROZOITES AND MEROZOITES"
XP002594712

Database accession no. PREV199191051186

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US;
1996, FORNEY J R ET AL: "Efficacy of serine protease inhibitors against *Cryptosporidium parvum*
infection in a bovine fallopian tube epithelial cell culture system" XP002594713

Database accession no. PREV199699156879

CHOUDHURY R. ET AL.: "Identification, purification and characterization of a secretory serine protease
in an Indian strain of *Leishmania donovani*." MOL. CELL. BIOCHEM., vol. 320,
2009, pages 1-14, XP002594714

PIGUET P.F. ET AL.: "delayed mortality and attenuated thrombocytopenia associated with severe
malaria in urokinase- and urokinase receptor-deficient mice." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 68, no.
7, juillet 2000
(2000-07), pages 3822-3829, XP002594715

VERDOT L. ET AL.: "Cystatins up-regulate nitric oxide release from interferon gamma-activated mouse
peritoneal macrophages" J. BIOL. CHEM., vol. 271, no. 45,
1996, pages 28077-28081, XP002594716

DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US;
1983, DEJKRIENGKRAIKHUL P-N ET AL: "REQUIREMENT OF MALARIAL PROTEASE IN THE
INVASION OF HUMAN RED CELLS BY MEROZOITES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM*"
XP002594717

Database accession no. PREV198376082433

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

CARDIGAN R.A. ET AL.: "Determination of plasma aprotinin levels by functional and immunological
assays" BLOOD COAGULATION AND FIBRINOLYSIS, vol. 12,
2001, pages 37-42, XP002594711

N° d'enregistrement national : 1050430

N° de publication : 2955496

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT